

**AKTIVE IMMUNISIERUNG
GEGEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA
MIT EINER ZELLMEMBRANPROTEIN
-VACCINE IM MÄUSEMODELL**

Gerhard Strigl

AUS DEM INSTITUT FÜR CHIRURGISCHE FORSCHUNG
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR : PROF. DR. MED. DR. MED. H.C. W. BRENDEL

VORGELEGT ÜBER DAS

INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE, INFektions-
UND SEUCHENMEDIZIN DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN
VORSTAND: PROF. DR. DR. H.C. MULT. A. MAYR

AKTIVE IMMUNISIERUNG GEGEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA
MIT EINER ZELLMEMBRANPROTEIN-VACCINE
IM MÄUSEMODELL

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER TIERMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VON
GERHARD STRIGL
AUS
MAINBURG

MÜNCHEN 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. J. Unshelm

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A <u>EINLEITUNG</u>	1
B <u>SCHRIFTTUM</u>	3
1. <u>Besonderheiten der Infektion mit Pseudo-</u> <u>monas aeruginosa</u>	3
2. <u>Typisierung von Pseudomonas aeruginosa</u>	8
3. <u>Prophylaktische und therapeutische Maßnahmen</u> <u>zur Beeinflussung von Infektionen durch</u> <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	11
3.1 Chemotherapie	11
3.2 Immunologische Beeinflussung von Infek- tionen durch Pseudomonas aeruginosa	13
3.2.1 Allgemeines	13
3.2.2 Medikamentelle Steigerung der nicht- erregerspezifischen Abwehr	13
3.2.3 Passive Immunisierung	15
3.2.4 Aktive Immunisierung	17
3.2.4.1 Allgemeines	17
3.2.4.2 Ganzzellvaccinen	19
3.2.4.3 Ribosomenvaccinen	20
3.2.4.4 Lipopolysaccharid-Vaccinen	21
3.2.4.5 Hochmolekulare Polysaccharid-Vaccinen	23
3.2.4.6 OEP ("Original Endotoxin Protein" bzw. "Common Protective Antigen") und Toxoid-Vaccinen	25
3.2.4.7 Polyvalente Vaccinen aus Zellwandextrakten: PEV-01 und "Behring"-Vaccine	26
3.2.4.8 Protein-Vaccine	28

	Seite
C <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	33
1. <u>Material und Methoden</u>	33
1.1 Bakterien	33
1.2 Versuchstiere	33
1.3.1 Herstellung der Zellmembran-Vaccine	34
1.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
1.4 Aktive Immunisierung	36
1.4.1 Vorversuche	36
1.4.1.1 Prüfung der Vaccine auf Unschädlichkeit und Ermittlung der optimalen Impfstoffmenge	36
1.4.1.2 Auswirkung verschiedener Adjuvantien und Applikationsformen auf die Immunantwort	36
1.4.2 Immunisierungsschema	37
1.4.3 Verlauf des Antikörpertiters über mehrere Monate	37
1.5 Bestimmung der Antikörpertiter	37
1.5.1 Enzyme-linked-immunosorbent-assays (ELISA)	37
1.5.1.1 Bestimmung der Immunglobulinklassen bzw. -subklassen	38
1.5.2 Immunfluoreszenzmessungen	39
1.5.3 Western Immunoblotting	40
1.6 Schutzversuch	41
1.7 Histologische Untersuchungen	42
2. <u>Ergebnisse</u>	43
2.1 Anzüchtung der Bakterien	43
2.2 Isolierung der Membranproteine F, H ₂ und J	43
2.3 Vorversuche zur Optimierung der Impfmethode	44
2.4 Verlauf des Antikörpertiters	45

	Seite
2.5	Immunogenität der Vaccine 46
2.5.1	Messung der Antikörpertiter von immuni- sierten Mäusen mittels ELISA 46
2.5.2	Messung der Antikörpertiter durch Immun- fluoreszenz 46
2.5.3	Nachweis der Antikörper durch Western Immunoblotts 47
2.5.4	Bestimmung der Immunglobulinklassen bzw. -subklassen 47
2.6	Schutzversuch 48
D	<u>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u> 60
E	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u> <u>SUMMARY</u> 73
F	<u>ANHANG</u> 74
G	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u> 75



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A EINLEITUNG

Die letzten zwei Jahrzehnte ließen eine allmähliche Abnahme der durch obligat pathogene Erreger verursachten akut-lebensbedrohenden bakteriellen Infektionskrankheiten erkennen. An deren Stelle beobachtete man den Anstieg von weniger akuten, persistierenden, bakteriellen Infektionen, die durch Erreger verursacht wurden, welche früher als wenig pathogene, opportunistische Keime angesehen wurden.

Pseudomonas aeruginosa stellt neben Colibakterien und Klebsiellen den Hauptvertreter der opportunistischen gram-negativen Bakterien dar. Der auch als Naßkeim bezeichnete Erreger benötigt feuchtes Milieu und Sauerstoff für die Aufrechterhaltung seiner Lebensfunktionen.

Der ubiquitär vorkommende Keim findet sich ohne klinische Symptomatik im Gastrointestinaltrakt bei 7-25 % von gesunden Personen (25).

Seine krankmachende Wirkung entfaltet *Pseudomonas aeruginosa* hauptsächlich bei bereits vorgeschädigten oder in ihrer Abwehr geschwächten Individuen. Die nahezu ausschließlich als nosokomiale Infektion auftretende *Pseudomonas*-Sepsis findet sich vor allem bei Patienten mit Mukoviszidose, schweren Verbrennungen oder bei Patienten mit bösartigen Neubildungen, welche aus diesem Grunde einer immunsuppressiven Therapie unterzogen sind.

Die Behandlung einer Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* stößt auf große Schwierigkeiten wegen der bekannten Neigung des Erregers, multiple Resistenzen auszubilden (76).

Die Prognose septischer Infektionen mit diesem Keim ist unverändert ernst. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß der Ausgang der überwiegend als nosokomiale Infektion auftretenden *Pseudomonas*-Sepsis kaum von der in vitro-Empfindlichkeit des jeweiligen Stammes gegenüber den

verwendeten Antibiotika oder den von ihnen erreichten Serumspiegeln abhängt, sondern fast ausschließlich von der Schwere der zugrundeliegenden Erkrankung bzw. der Dauer einer immunsuppressiven Therapie bestimmt wird (7).

Es überrascht daher nicht, daß das Interesse in der letzten Zeit wieder verstärkt auf die Möglichkeiten einer immunologischen Beeinflussung von *Pseudomonas*-Infektionen durch aktive oder passive Immunisierung gelenkt wurde.

In jüngster Zeit wurde mehrfach auf die Möglichkeit hingewiesen, äußere Zellmembranproteine von *Pseudomonas aeruginosa* als Vaccine zu verwenden (32, 44).

R.E.W. Hancock (90) konnte zeigen, daß alle 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* ein gemeinsames äußeres Zellmembran-Proteinmuster besitzen, welches aus den drei Proteinen F, H₂ und J besteht. Damit war zum ersten Male ein für alle Serotypen gemeinsames Antigen definiert.

Somit ergab sich für die hier vorliegende Arbeit als Zielsetzung, herauszufinden, ob eine Membranprotein-Vaccine, bestehend aus den äußeren Zellmembranproteinen F, H₂ und J, eine Schutzwirkung gegen alle bekannten 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* aufweist.

B SCHRIFTTUM

1. Besonderheiten der Infektion mit Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa ist gegenwärtig einer der wichtigsten Erreger von Infektionen bei hospitalisierten Patienten.

Da dieser Personenkreis zumeist in seiner Immunabwehr geschwächt ist, stellt der Keim eine außerordentliche Bedrohung für ihn dar. Noch vor einigen Jahren wurde *Pseudomonas aeruginosa* als harmloser, nur fakultativ pathogener Organismus betrachtet. Seine Gefährlichkeit wurde erst in letzter Zeit besser erkannt, und deshalb wurde *Pseudomonas aeruginosa* als opportunistischer oder Problemkeim eingestuft.

Mayr (80) versteht darunter ubiquitär vorkommende, schwach virulente bzw. fakultativ pathogene Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren, welche in jüngster Zeit für Mensch und Tier deshalb zu Problemkeimen wurden, weil sie zum einen eine enorme Verbreitungs- und Vermehrungschance gefunden haben und dadurch gehäuft zu Infektionen führen, zum anderen konvertieren diese Infektionen in bedeutend höherem Ausmaß als früher in Krankheiten. Als ursächlicher Faktor von größter Bedeutung wird die durch eine Änderung des normalen Gesundheitsstatus induzierte Schwächung der körpereigenen Abwehr des Individuums angesehen.

Die ubiquitär in der Umwelt vorkommenden Pseudomonaden sind üblicher Bestandteil der bakteriellen Flora von Mensch und Tier. Sie finden sich oft äußerlich auf der Haut der Achsel- und anogenitalen Gegend, und sind daneben Teil der transitorischen mikrobiellen Flora des Intestinaltraktes.

Trotz der nahezu unvermeidbaren Exposition gegenüber diesen Bakterien koexistieren Mensch und Tier im allgemeinen gut mit den Erregern, weswegen Primärinfektionen selten vorkommen.

Indessen ist jegliche Veränderung des normalen Gesundheitsstatus mit einer vermehrten Besiedelung des Makroorganismus durch *Pseudomonas aeruginosa* assoziiert, und falls zusätzlich noch ein einzelner oder eine Kombination von prädisponierenden Faktoren vorliegen, erhöht sich die Empfänglichkeit des Individuums gegenüber Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa*. Reynolds (118) führte drei dieser Faktoren an:

- 1) Chronische schwächende Erkrankungen, welche oft eine verlängerte Hospitalisierung erfordern;
- 2) Eine vorangegangene antibiotische Therapie, besonders mit Antibiotika, welche über ein breites Erregerspektrum verfügen;
- 3) Unausgeglichene körpereigene Abwehr, die entweder auf eine Primärerkrankung zurückzuführen ist, oder sich als Folge einer immunsuppressiven oder zytotoxischen Therapie entwickelt hat.

Darauf Bezug nehmend erklärt sich, daß ein bestimmter Patientenkreis ein vermehrtes Vorkommen von *Pseudomonas*-Infektionen verzeichnet, vor allem Personen mit bösartigen Neubildungen, chronischen Lungenerkrankungen, schweren Verbrennungen und nach Nierentransplantationen.

Reynolds und Pennington (116) berichteten gleichfalls von Infektionen mit hoher Mortalität durch *Pseudomonas aeruginosa* beim immunsupprimierten Patienten, trotz der Verwendung von in vitro gut wirksamen Antibiotika und der großen Fortschritte, welche speziell auf den Intensivstationen getätigt wurden. Diese Beobachtungen veranlaßten Peterson (101) zur Folgerung, daß der medizinische Fortschritt ironischerweise selbst in weitem Maße verantwort-

lich sei für das in Erscheinungtreten von *Pseudomonas aeruginosa* als bedeutungsvollem Krankheitserreger. Er führte das darauf zurück, daß die Verwendung von Breit-spektrum-Antibiotika die mikrobielle Ökologie verändert habe, einschließlich einer Beeinflussung derjenigen humanen Bakterienflora, welche ursprünglich die Besiedelung durch *Pseudomonas aeruginosa* in Grenzen gehalten hatte. Neu (93) führte in einer Darstellung der klinischen Rolle von *Pseudomonas aeruginosa* an, daß sich der Erreger in den Krankenhäusern im Intestinaltrakt von Patienten und Pflegepersonal findet, daneben als Besiedler von Wunden, Urin und Respirationstrakt, und in bestimmten Lebensmitteln vorliegt; zusammengefaßt in allen Bereichen gefunden wird, die eine gewisse Mindestfeuchte aufweisen.

Pseudomonas aeruginosa ist empfindlich gegenüber Trockenheit, kann aber in Wasser für mehrere Monate bei Umgebungstemperatur überleben. Eine große Anspruchslosigkeit in bezug auf Nahrungsbedürfnisse und die Fähigkeit, eine Vielzahl von organischen chemischen Substanzen zu metabolisieren, befähigen *Pseudomonas aeruginosa*, in Flüssigkeiten und feuchten Nischen der verschiedenen Krankenhausabteilungen zu überleben und sich zu vermehren.

Erreger-Reservoirs in Kliniken, die als Übertragungsvektoren für *Pseudomonas aeruginosa* dienen, sind Medikamente wie zum Beispiel Infusionsflüssigkeiten oder ophthalmologische Lösungen, ärztliche Instrumente wie Injektions-spritzen, medizinisch-technische Geräte oder kontaminierte Lebensmittel (93).

Farmer (28) wies darauf hin, daß eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* zum größten Teil auf hospitalisierte Patienten beschränkt ist, welche den Erreger entweder in Form einer exogenen Infektion durch Kontakt mit belebten und unbelebten Vektoren, oder in Form einer endogenen Infektion ausgehend von Organismen, welche sich auf ihrer

Haut oder in ihrem Respirations- bzw. Intestinaltrakt befinden, erwerben.

Die wichtigsten Quellen für *Pseudomonas aeruginosa* sind infizierte Wunden, Urin und Verletzungen, welche ein Exsudat produzieren; diese feuchten Quellen kontaminieren Kleidung, Betttücher und Geräte, davon ausgehend wird der Erreger durch die Hände von Klinikpersonal oder Besuchern an andere Patienten weitergegeben (36).

Die Übertragung von Person zu Person ist der wichtigste Modus der Verbreitung. Dagegen scheint eine aerogene Ansteckung nicht häufig vorzukommen.

Doggett (25) gibt an, daß das Spektrum der Erkrankungen, die durch *Pseudomonas aeruginosa* verursacht werden, von Harnwegsinfektionen über Septikämie zu Pneumonie und Meningitis reicht.

Insbesondere bei Patienten, die an Mukoviszidose erkrankt sind, führt der Keim zu schwerwiegenden Lungenveränderungen (65).

Einen Problemkeim stellt *Pseudomonas aeruginosa* auch für Krebspatienten dar. Vor allem bei Personen mit Leukämie und anderen Knochenmarkserkrankungen ist der Erreger extrem häufig nachzuweisen (123).

Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* sind verantwortlich für über 25 % der Todesfälle bei Kindern mit Leukämie.

Auch bei der Besiedelung von Brandwunden ist *Pseudomonas aeruginosa* dominant. Dabei findet sich der Keim selten während der ersten 24 Stunden nach der Verbrennung. Mit dem fünften Tag nach der Verletzung zeigen dagegen über 60 % der Patienten eine Besiedelung mit dem Erreger (25).

Durch die Besonderheiten der *Pseudomonas*-Infektionen, einerseits sein Auftreten als Sekundärerreger bei bereits durch chronische Erkrankungen oder immunsuppressive Therapie vorgeschädigten Patienten, und andererseits seine Neigung zur Entwicklung Plasmid-vermittelter Resistenzen

und die dadurch hervorgerufene herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika, wird die Therapie in hohem Maße erschwert.

2. Typisierung von *Pseudomonas aeruginosa*

Homma (54) postulierte als zentrale Forderung an eine Vaccine gegen *Pseudomonas aeruginosa* diejenige nach Gewährleistung eines umfassenden Schutzes gegenüber allen unterschiedlichen Serotypen der Spezies.

Aufgrund der Vielzahl an Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* sind verschiedene Tests zur Differenzierung des Erregers entwickelt und von Brokopp (15) beschrieben worden.

Kabat (59) erwähnte als Basis der Klassifizierung vieler gramnegativer Bakterien die Erkennung immunologischer Unterschiede bei Geisel-(H)- und somatischen-(O)-Antigenen der verschiedenen Spezies.

Um das H-Antigen von *Pseudomonas aeruginosa* aufzudecken, wurden Testseren gegen intakte, nicht hitzebehandelte Zellen hergestellt. Pitt (108) stufte die H-Spezifität dieser Seren als fragwürdig ein, da in ihnen ebenso Antikörper gegen hitzelabile Antigene wie Pili und einige somatische Faktoren (5) vorhanden sind. Außerdem erscheint die H-serologische Typisierung alleine als nicht befriedigend, da fast die Hälfte aller Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* das gleiche H-Antigen besitzen (110). Diese Tatsache veranlaßte Ansorg (6) und Pitt (109), H-serologische und O-serologische Typisierung zu kombinieren, was sich als nützlich bei der weitergehenden Auftrennung der häufiger vorkommenden O-Gruppen erwies.

Die am häufigsten verwendeten Schemata zur serologischen Differenzierung von *Pseudomonas aeruginosa* basieren in der Regel auf in vitro-Versuchen, wie der Agglutination mit Präparationen aus der Zellwand, den sog. somatischen-O-Antigenen.

Das Typisierungsverfahren beruht auf den 12 hitzestabilen somatischen-O-Antigenen, die erstmals von Habs beschrieben wurden (41). Durch die Definition von sieben weiteren

heterologen O-spezifischen Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* entstand auf Betreiben des "Subcommittee on Pseudomonaceae and Related Organisms of the International Association of Microbiological Societies" ein von Lanyi (69) beschriebenes, einheitliches System zur Serotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa*, das "International Antigenic Typing Scheme" (IATS), mit 19 definierten Serotypen. Die serologische Spezifität der Klassifikation der O-Antigene von *Pseudomonas aeruginosa* liegt im unterschiedlichen Bau der Region I des LPS der äußeren Membran (124).

Neben der Serotypisierung kann man *Pseudomonas aeruginosa* auch aufgrund seiner Pyocin-Produktion differenzieren.

Pyocin ist eine antibiotische Substanz, die wie alle anderen Bacteriocine, die von den verschiedensten Bakterien produziert werden, die Fähigkeit besitzt, bestimmte Stämme ihrer Spezies zu hemmen (115).

Govan (40) konnte 105 verschiedene Muster der bakteriziden Aktivität von Pyocin gegen *Pseudomonas aeruginosa* unterscheiden, wodurch gezeigt wurde, daß ihre Heterogenität ausreicht, um als Mittel für epidemiologische Studien benützt zu werden. Nachteilig wirken sich bei dieser Methode die Unstabilität der Substanzen und die mangelnde Übereinstimmung mit der Differenzierung nach Serotypen aus.

Der Differenzierungsgrad der Pyocin-Empfindlichkeitstests ist hoch (114), aber Lysis-Muster sind nicht reproduzierbar, wahrscheinlich weil die Lysate ein Gemisch von Pyocinen enthalten, was zu einem Überlappen der Reaktionen führt. Da die Technik zur Pyocin-Typisierung außerdem noch recht schwerfällig ist, wird diese Methode meist nur dann benützt, wenn die Serotypisierung nicht ausreicht, wie z.B. bei größeren Epidemien in Krankenhäusern, die eine ausführliche Differenzierung von *Pseudomonas aeruginosa*

verlangen (8).

Gleiches gilt auch für die Typisierung mittels Phagen (73). Meitert & Meitert schlugen vor (86), die Ergebnisse der O-Serotypisierung und der Phagentypisierung in einem hierarchischen Weg zu interpretieren. Auf dieser Grundlage bildet die Separation nach O-Serotypen die erste Unterscheidung, und Phagentypisierungsmuster werden benutzt, um zwischen den Stämmen derselben O-Gruppe zu differenzieren.

3. Prophylaktische und therapeutische Maßnahmen zur Beeinflussung von Infektionen durch Pseudomonas aeruginosa

3.1 Chemotherapie

Durch die vermehrte Anwendung von Antibiotika in der Therapie von bakteriellen Infektionen ließ sich ein Erregewandel bei der Besiedelung der Patienten feststellen (64). Pruitt (112) beobachtete eine Verdrängung der früher bei Verbrennungen dominierenden grampositiven Erreger durch gramnegative Bakterienspezies, insbesondere durch *Pseudomonas aeruginosa*.

Eine weitere Folge der Zunahme der Chemotherapie war die Ausbildung von Resistenzen gegenüber einer Vielzahl der antimikrobiellen Reagenzien. Brown (16) beschrieb bereits 1975 in einem eigenen Werk diese Erscheinung, wobei er insbesondere darauf hinwies, daß *Pseudomonas aeruginosa* unempfindlich gegen Verbindungen sei, welche anderen gramnegativen Spezies gegenüber Wirksamkeit aufwiesen.

Siegenthaler et al. (125) berichteten, daß von den derzeit in Gebrauch befindlichen Antibiotika gegen *Pseudomonas aeruginosa* hauptsächlich Verwendung finden unter den Penicillinen die Carboxypenicilline, wie Carbenicillin, Sulbenicillin, Ticarcillin, Carindacillin, Carfecillin und das Ureidopenicillin Azlocillin; und unter den Amino-glykosiden Substanzen wie Gentamycin, Tobramycin, Sisomycin, Netilmycin und Amikacin.

Für eine Reihe neuerer Antibiotika wie Apalcillin, Piperacillin, Cefsulodin, Cefaperazone etc. ist die Wirkung gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* auch gezeigt worden, allerdings beschränken sich die Ergebnisse hauptsächlich auf experimentelle Untersuchungen.

Bevorzugte Verwendung finden unter den Penicillinen vor

allem Ticarcillin in der parenteralen Applikation, und seltener Carindacillin und Carfecillin bei der oralen Administration anlässlich Infektionen der Harnwege.

Unter den Aminoglykosiden findet Tobramycin hauptsächliche Anwendung als Mittel der Wahl bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa*, wohingegen Amikacin in Reserve gehalten wird zum Gebrauch gegen Stämme, die gegenüber Gentamycin und Tobramycin resistent geworden sind.

In einer vor kurzem erschienenen Veröffentlichung über die Bewertung verschiedener antimikrobiell wirkender Reagenzien gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* unterstrich Gilbert (37) von neuem, daß aufgrund der verfügbaren Erkenntnisse die Standardtherapie bei ernsten, lebensbedrohenden *Pseudomonas*-Infektionen die Kombination eines Aminoglykosids mit einem anti-*Pseudomonas* wirksamen Breitspektrum-Penicillin bilden sollte.

Grundsätzlich muß aber zur antimikrobiellen Therapie von *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen darauf hingewiesen werden, daß die Korrelation zwischen klinischem Erfolg und in vitro-Abschätzungen der Antibiotikaempfindlichkeit gering sein kann. Bryan (18) begründete diese Erscheinung damit, daß zum einen in vivo andersgeartete Verhältnisse vorliegen können, wie die effektiv erreichbare Serum- oder Gewebekonzentration des Antibiotikums, oder in vivo vorfindbare Veränderungen des bakteriellen Phänotyps.

Daneben betrifft eine Vielzahl der *Pseudomonas*-Infektionen Patienten mit schweren Primärerkrankungen und unausgeglichenem Immunsystem. Bei diesem Personenkreis hat die in vitro-Bewertung der Empfindlichkeit weniger Spielraum als bei Patienten mit intaktem Abwehrapparat (89, 113).

3.2 Immunologische Beeinflussung von Infektionen durch Pseudomonas aeruginosa

3.2.1 Allgemeines

Die immunologische Beeinflussung von Pseudomonas-Infektionen weist eine lange Tradition auf. Vor beinahe 100 Jahren schilderten Charrin und Roger (20) Versuche mit Kaninchen, die durch wiederholte Applikation kleiner Dosen von lebenden Mikroben unempfindlich für eine Infektion gemacht wurden.

Indessen bestand offenbar nur ein geringer Bedarf nach Pseudomonas-Vaccinen vor Beginn der chemotherapeutischen Ära. Nach deren Eintreten kristallisierten sich der Gebrauch von zytotoxischen und immunsuppressiven Therapie-maßnahmen, verbunden mit dem sich parallel dazu entwickelnden Selektionsdruck durch den zunehmenden Einsatz von Antibiotika, als die Hauptursachen für das Zutagetreten von Pseudomonas aeruginosa als einem der prominentesten Erreger beim immunsupprimierten Patienten heraus.

Aus diesem Grunde wurde die Suche nach immunologischen Maßnahmen zur Prophylaxe und Behandlung von Pseudomonas-Infektionen in letzter Zeit verstärkt vorangetrieben.

3.2.2 Medikamentelle Steigerung der nichterregerspezifischen Abwehr

Neben der Erzeugung einer spezifischen, gegen ein bestimmtes Antigen gerichteten Immunität, steht als weiteres Mittel bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten die Stimulierung der antigenunspezifischen Abwehrmechanismen zur Verfügung.

Da über die Wirkungsweise der körpereigenen Abwehrmechanismen in jüngster Zeit mehr Klarheit gewonnen werden konnte, ist es nach Mayr (81) möglich, die einzelnen Aktivitäten gezielt künstlich (medikamentell) zu stimulieren, und damit die Infektabwehr in einem Organismus kurzfristig gezielt zu erhöhen. Dieser, durch Applikation von resistenzerhöhenden Präparaten im Sinne einer aktiven Paramunisierung (82) erzeugte Zustand einer kurzzeitig erhöhten Infektabwehr wird als Paramunität bezeichnet. Dieser Begriff schließt Promunität, Depressionsimmunität und unspezifische Resistenz in der von Brandis (13) gegebenen Definition ein, erweitert aber den Bereich der unspezifischen Infektabwehr vor allem durch die Induktion von Interferon und die Phase einer generellen Stimulierung bestimmter Lymphozytenpopulationen (82). Im einzelnen erfolgt durch die aktive Paramunisierung eine Anregung der Interferonproduktion, eine frühzeitige Stimulierung des lymphopoetischen Zellsystems, insbesondere eine Proliferation der T-Zellen, und eine Steigerung der Phagozytoseaktivität.

Mayr (81) wies darauf hin, daß die aktive Paramunisierung, prophylaktisch oder therapeutisch eingesetzt, bevorzugt solchen Infektionen begegnet, welche durch opportunistische Problemkeime, Mischinfektionen, infektiöse Faktorenkrankheiten und Infektionen durch ubiquitär verbreitete, schwachvirulente Erreger verursacht werden.

Zur Bekämpfung einer Pseudomonas-Wundinfektion wurde ein von Mayr (81) entwickelter biologischer Paramunitätsinducer eingesetzt. Das Präparat wurde aus einem für Säuger heterologen, attenuierten Avipoxvirus, das für die Schutzimpfung gegen Geflügelpocken benutzt wird, mittels Gammabestrahlung gewonnen.

Mayr et al. (83) hielten fest, daß durch die prophylaktische und auch therapeutische parenterale Applikation mit dem oben beschriebenen Paramunitätsinducer die Morta-

litätsrate bei paramunisierten Mäusen signifikant gesenkt werden konnte, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren.

3.2.3 Passive Immunisierung

Die passive Immunisierung zielt entweder auf den Schutz des Individuums vor einer möglichen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* oder auf die Serumtherapie einer bereits eingetretenen Infektion ab (122), und besteht in der Applikation von künstlich hergestelltem Hyperimmunserum, Gammaglobulin-Präparaten oder Rekonvaleszentenserum.

Der Werdegang der passiven Immunisierung bei Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* weist eine interessante Entwicklung auf. Bocanegra (12) wies darauf hin, daß Immunplasma oder Gammaglobulin-Präparate die Mortalität bei Kindern mit *Pseudomonas*-Wundinfektionen nach schweren Verbrennungen reduzierte. Feingold (30) zitierte den Fall eines Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa*-Bakteriämie, der sich als resistent gegenüber einer antibiotischen Therapie erwies, wogegen sich der Patient nach Verabreichung eines hochtitrigen Rekonvaleszentensersums erholte.

Die Auswirkung der Behandlung von Patienten mit großflächigen Verbrennungen mittels Hyperimmunplasma untersuchte Feller (31). Er kombinierte die Serumtherapie mit einer simultan durchgeführten aktiven Immunisierung anhand einer phenol- und hitzeinaktivierten monovalenten Vaccine. Er berichtete von guten Ergebnissen aufgrund dieser Simultanimpfung, wobei es allerdings nicht möglich war, den jeweils erzielten Effekt der aktiven von dem der passiven Immunisierung voneinander zu trennen.

In einer weiteren Studie erwähnten Jones et al. (56) die Prüfung der klinischen Bedeutsamkeit spezifischer Pseudo-

monas-Immunglobuline, die sie von gesunden Spendern nach Hyperimmunisierung mit einer polyvalenten Pseudomonas-Vaccine gewonnen hatten. Als besonders bemerkenswert erwies sich im Verlauf dieser Untersuchung, daß diese Pseudomonas-Antiseren überwiegend IgG-Antikörper enthielten. Diese Beobachtung ist deswegen von Interesse, seitdem Björnson (10) herausfand, daß IgG-Antikörper die effektivsten Pseudomonas-Opsonine darstellen und erhöhten Schutz gegenüber experimentellen Infektionen durch Pseudomonas aeruginosa bieten.

In Fällen von immunsupprimierten Patienten wird die alleinige Verabreichung von exogenen Immunglobulinen nicht ausreichen. Hier ist neben der Infusion von Immunsereen oder spezifischen Antikörpern eine Wiederherstellung des zirkulierenden Anteils der Granulozyten anzustreben.

Harvath et al. (48) postulierten nach Erfahrungen, die sie im Tierexperiment gewonnen hatten, die Transfusion von Granulozyten bis zu einem exzessiven Gehalt von 500 Zellen pro mm^3 . Überdies zogen sie den Schluß, daß die Restitution von Granulozyten den ansonsten fatalen Verlauf von experimentell ausgelöster Pseudomonas-Pneumonie bei neutropenischen Hunden positiv beeinflusst.

Mit Hilfe einer Kombination von passiver Immunisierung und Transfusion von Granulozyten bei Hunden, an denen durch Bestrahlung mit ^{60}Co eine Neutropenie induziert wurde, und die zudem an einer experimentell ausgelösten Pseudomonas-Pneumonie erkrankt waren, erzielte Kazmierowski (62) eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber den nur mit jeweils einer Komponente behandelten Tieren.

Polyklonale Antikörper gegen Exotoxin A, Elastase und LPS stellten Cryz et al. (22) her, wobei sie die Antigene aus verschiedenen Serotypen von Pseudomonas aeruginosa isoliert hatten. Ihre Arbeit hatte als Zielsetzung, einen Vergleich zwischen der Schutzwirkung von antibakte-

riell wirkenden, gegen LPS gerichteten Antikörpern, und antitoxisch funktionierenden, gegen Exotoxin A bzw. Elastase gerichteten Antikörpern zu ziehen. Die Untersuchungen, die anhand eines leukopenischen Mäusemodells durchgeführt wurden, zeigten das Vorhandensein einer signifikanten Schutzwirkung durch die anti-LPS-Antikörper, im Gegensatz zu den antitoxischen IgG-Präparationen. Allerdings wurde durch die passive Immunisierung mit Anti-LPS-IgG kein absoluter Schutz gegen eine Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* erzielt.

Basierend auf diesen Erkenntnissen entwickelten Sawada et al. (121) monoklonale Antikörper gegen die am meisten exponierten Bestandteile der Zellwand von *Pseudomonas aeruginosa*, LPS und Membranproteine. Die Autoren registrierten anlässlich eines im Mäusemodell durchgeführten Schutzversuches eine veritable Schutzwirkung durch die passive Immunisierung mit den verwendeten Antikörpern. Dabei war zur Erlangung einer 50 %-Schutzwirkung ein höherer Gehalt an anti-Membranprotein-Antikörpern als an anti-LPS-Antikörpern erforderlich.

3.2.4 Aktive Immunisierung

3.2.4.1 Allgemeines

Mayr (84) stellte dar, daß die aktive Schutzimpfung gegen Infektionskrankheiten zu den ältesten und zugleich erfolgreichsten prophylaktischen Maßnahmen gehört. Die hierfür entwickelten Impfstoffe sind die wirksamsten Arzneimittel überhaupt. Mit Impfantigendosen in der Größenordnung von weniger als 1/1000 mg Protein werden im Impfling Immunreaktionen stimuliert, die über Jahre einen spezifischen Schutz gegenüber Infektionskrankheiten gewähren können.

Die aktive Immunisierung entspricht der medikamentellen Erzeugung eines spezifischen Schutzes, oder Immunität, gegen ganz bestimmte Krankheitserreger oder ihre Toxine. Als fundamentale Eigenschaft gilt dabei die Erreger- oder Antigenspezifität des Schutzes, der sich gegen die Vermehrung und Ausbreitung des betreffenden Erregers richtet.

Für die Herstellung eines Impfstoffes gegen *Pseudomonas aeruginosa* wurden das komplette Bakterium mit unversehrt gebliebener Zellumhüllung oder verschiedene isolierte Bestandteile der Bakterienzelloberfläche als antigen wirksame Substanzen herangezogen.

Die Zellumhüllung der gramnegativen Bakterien setzt sich nach Seltmann (124) von innen nach außen aus der zytoplasmatischen Membran, dem darauf folgenden periplasmatischen Spalt und aus der von Peptidoglykanschicht und äußerer Zellmembran gebildeten Zellwand (Abb. 1) zusammen.

Die Zellumhüllung ist diejenige Struktur, durch deren Hilfe das Bakterium mit seiner Umgebung in Wechselwirkung treten kann, und darauf Bezug nehmend, ist die Zellumhüllung von *Pseudomonas aeruginosa* nach Costerton (21) von überragender Bedeutung für die Persistenz und das Wachstum des Organismus im Zuge einer Infektion.

Einige Bestandteile der Zellwand bewerkstelligen die Adhäsion der Bakterienzellen untereinander und die Bildung von Mikrokolonien, während andere die Passage von Nährstoffen und den Ausschluß von humoralen und synthetischen, antimikrobiell wirksamen Reagenzien kontrollieren.

Antigene Determinanten von Bedeutung sind neben Geißeln, extrazellulären Schleimpolysacchariden und Exotoxinen vor allem LPS und Membranproteine.

3.2.4.2 Ganzzellvaccinen

Werden dem Impfling sogenannte Ganzvaccinen (84), also komplette Bakterienzellen mit intakter Zellumhüllung, verabreicht, so muß er sich mit allen in der komplexen Struktur der Impfkkeime enthaltenen Aufbausubstanzen und Antigenen auseinandersetzen.

Die zwei erstmals am Patienten eingesetzten Impfstoffe waren ihrer Zusammensetzung nach Ganzzellvaccinen.

Sachs (120) verwendete eine hexavalente Präparation und fand höhere Überlebensraten unter den Patienten, welche mehr als das Dreifache der als Normaldosis erachteten Impfstoffmenge erhalten hatten. Allerdings war der Unterschied zu den mit Normaldosis immunisierten Patienten nicht signifikant.

Feller und Pierson (31) benutzten "historische Kontrollen" anstelle von "echten" Kontrollpatienten und verabfolgten die Vaccine zusammen mit Hyperimmunplasma an 100 Personen. Die Mortalität in der immunoprophylaktisch betreuten Gruppe betrug 11 %, in der historischen "Kontrollgruppe" dagegen 39 %, wobei das Vorkommen einer Pseudomonas-Sepsis in der "Kontrollgruppe" überhaupt nur 51 % betrug. Feller verwendete nur einen einzigen Stamm von Pseudomonas aeruginosa in seiner Vaccine, was er auf die Beobachtung stützte, daß die Mehrzahl der auf seiner Station registrierten Pseudomonas-Infektionen durch diesen einzigen Serotyp verursacht wurden. Andererseits wird im Grunde genommen von jedem klinischen Zentrum, welches Verbrennungsoffer oder andere Patienten mit einem hohen Risiko für die Entwicklung einer Pseudomonas-Infektion behandelt, hervorgehoben, daß es sich um eine Vielzahl von Serotypen handelt, welche gravierende Infektionen verursachen.

Eine Untersuchung der Zusammenhänge von Serotyp und Virulenz im Mäusemodell wurde von Markman et al. (79) durch-

geführt. Zur Immunisierung verwendeten sie durch Formalin inaktivierte Ganzzellvaccinen von 28 verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen. Dabei fiel ihnen insbesondere die geringe Korrelation zwischen Virulenz und Immunogenität der Impfstämme auf, worauf sie vermuteten, daß sich die immunogenen Determinanten der Vaccinepräparationen von den Virulenzfaktoren unterscheiden könnten.

In Übereinstimmung hierzu berichteten Miler et al. (87) von Untersuchungen, welche auf eine untergeordnete Beziehung zwischen der herbeigeführten Schutzwirkung und der Virulenz des Vaccinestammes schließen lassen.

3.2.4.3 Ribosomenvaccinen

In einer Studie aus dem Jahre 1983 berichteten Lieberman und Ayala (72) von der ausgezeichneten Schutzwirkung, die mit einer Ribosomenvaccine im Einsatz gegen *Pseudomonas aeruginosa* erzielt wurde. Sie korrigierten damit die noch 1978 von Lieberman selbst vertretene Auffassung (71), daß die immunisierende Wirkung von Ribosomenvaccinen hauptsächlich durch die Kontamination mit LPS zustande kommen würde. Zu diesem Umdenken kam es, als die Autoren eine Schutzwirkung der Ribosomenvaccine bei C3H/HeJ-Mäusen beobachteten, einer Mäuserasse, die durch einen genetischen Defekt unempfindlich gegen alle biologischen Auswirkungen von LPS ist. Aufgrund der neueren Ergebnisse zogen sie den Schluß, daß als Alternative zu LPS als dem effektiven immunogenen Bestandteil der Ribosomenvaccine, möglicherweise den darin enthaltenen Membranproteinen die entscheidende immunisierende Rolle zufallen könnte.

3.2.4.4 Lipopolysaccharid-Vaccinen

Als Kandidaten für die Herstellung eines Impfstoffes gegen *Pseudomonas aeruginosa* bieten sich eine Reihe von antigenen Determinanten in der Zellumhüllung des Bakteriums an. Eagon (26) fand bei der Untersuchung der Ultrastruktur der Zellumhüllung von *Pseudomonas aeruginosa* heraus, daß es sich bei dem Keim um einen typischen gramnegativen Erreger handelt, dessen äußere Zellmembran aus Lipiden, Proteinen und Lipopolysacchariden besteht.

Über den Aufbau der Lipopolysaccharide vermerkte Seltmann (124), daß sie einerseits mit ihrem inneren, hydrophoben Anteil, der sog. Lipid A-Komponente, in der äußeren Membran verankert sind. Der äußere, hydrophile Anteil, stellt dagegen ein aus zwei unterschiedlichen Regionen bestehendes, langkettiges Polysaccharid dar, welches von den Bakterien weg in das umgebende Medium ragt. An das Lipid A ist die Region II, das Kernpolysaccharid ("core") gebunden. Für die Serotypisierung von *Pseudomonas* machte man sich die Tatsache zunutze, daß die Struktur der sich ganz außen befindenden Region I von Serotyp zu Serotyp Unterschiede aufweist, was Wilkinson (129) bereits 1975 erwähnte.

Da die von Feller (31) hergestellte Vaccine nur monovalenten Charakter hatte, aber Vertreter jedes einzelnen der definierten Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* eine Infektion verursachen können, wurde eine heptavalente Vaccine, bestehend aus den sieben verschiedenen LPS-Antigenen des Fisher-Immuntypisierungsschemas (33) hergestellt. Hannessian (46) führte an, daß die bei Parke-Davis unter der Bezeichnung "Pseudogen" produzierte Vaccine aus Phenolextrakten der Zellwand von *Pseudomonas aeruginosa* besteht.

Alexander und Fisher (4) untersuchten die Wirkung von "Pseudogen" in einer Studie mit 322 Patienten, die Ver-

brennungen von mehr als 20 % der Körperoberfläche erlitten hatten. Dabei entsprach der durch den Impfstoff hervorgerufene Grad der Schutzwirkung direkt der gegebenen Vaccinedosis. Keiner der Patienten, die 25 µg Pseudogen/kg erhalten hatten, starb an Pseudomonas-Septikämie, während 12,5 % der Patienten mit niedrigerer Dosis starben. Von den ungeimpften Kontrollpatienten starben 14,5 % an Pseudomonas-Sepsis. Daneben erwähnten die Autoren, daß nach der Verabreichung wirksamer Dosen lokale und systemische Reaktionen auftraten. Diese variierten von lokalem Schmerz und Indurationen an der Injektionsstelle bis hin zu allgemeinen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerz und Übelkeit.

Für das Auftreten der toxischen Nebenwirkungen der Vaccinen auf LPS-Basis wird deren Lipidkomponente, das Lipid A, verantwortlich gemacht.

Young et al. (133) vaccinierten Patienten mit Leukämie, Lymphomen und soliden Tumoren, wobei sie verschiedene Dosierungen der heptavalenten Vaccine benutzten. Sie stellten eine statistisch signifikante Erhöhung der Zahl der Überlebenden unter den vaccinierten Patienten fest; ein Ergebnis, das von Haghbin et al. (42) und Pennington et al. (97) bestätigt wurde. Ebenfalls Pennington (98) beobachtete ein Nachlassen der Atembeschwerden bei Patienten mit Mukoviscidose für mehrere Monate nach der Behandlung mit Pseudogen, wobei jedoch *Pseudomonas aeruginosa* nicht aus dem Sputum der erkrankten Personen eradikiert werden konnte.

Zwei Autoren gaben ihre Erfahrungen über den Einsatz der Pseudogen-Vaccine im Tiermodell wieder. Long et al. (75) führten Untersuchungen mit Nerzen durch, einer Tierart, die eine artspezifische, außergewöhnlich hohe Empfänglichkeit für hämorrhagische Pneumonien, verursacht durch *Pseudomonas aeruginosa*, aufweist. Die Autoren stellten fest, daß Nerze, die über LPS-Antikörper verfügten, wel-

che sie durch Vaccinierung oder auf natürliche Art erworben hatten, resistent gegen eine experimentelle Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* waren.

Pennington (99) entwickelte das experimentelle Modell einer chronischen *Pseudomonas aeruginosa*-Bronchopneumonie beim Meerschweinchen, um die Schutzwirkung einer LPS-Vaccine zu erproben. Aufgrund seiner Untersuchungen zog er den Schluß, daß die prophylaktische Immunisierung mit Pseudogen einen Schutz gegen eine nachfolgende experimentell verursachte *Pseudomonas*-Bronchopneumonie bieten kann, wohingegen eine Immunisierung nach bereits etablierter Infektion nicht von Nutzen sei.

Hohe Immunogenität und Schutzwirkung durch eine multivalente LPS-Vaccine wurden von Cryz et al. (23) anhand einer *Pseudomonas*-Wundinfektion im Mäusemodell nachgewiesen. Als Impfstoff wurde dabei eine nonavalente Vaccine verwendet, welche jeweils die gleiche Menge an LPS von neun unterschiedlichen Serotypen enthielt. Das dabei registrierte Maß der Schutzwirkung korrelierte mit den LPS-Antikörpertitern und war streng Serotyp-spezifisch. Maximale Schutzwirkung wurde dann erreicht, wenn die IgG-Titer am höchsten waren. Ein Immunisierungsschema, welches nur eine IgM-Antwort hervorrief, gewährte gleichfalls noch ein hohes Maß an Schutzwirkung. Die Autoren schlugen deshalb vor, daß die anti-LPS-Antikörper der beiden Immunglobulinklassen eine hohe Schutzwirkung gewährleisten könnten.

3.2.4.5 Hochmolekulare Polysaccharid-Vaccinen

Die Impfstoffe auf LPS-Basis weisen neben dem Vorteil einer sehr hohen Immunogenität den Nachteil auf, daß sie bei therapeutischer, hoher Dosierung schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen. Braude et al. (14) beobachteten toxi-

sche Wirkungen nach hochdosierten LPS-Gaben bei Mensch und Tier. Es stellten sich in diesem Zusammenhang intravaskuläre Koagulation, niedriger Blutdruck, Nierenrindennekrose und letaler Endotoxinschock ein.

Dementsprechend berichteten Pennington (96), Young et al. (133) sowie Haghbini et al. (42) von profunden Nebenwirkungen bei Patienten, die einer Behandlung mit Vaccinen auf LPS-Basis unterzogen worden waren.

Da die Toxizität der LPS in deren Lipid A-Anteil festgelegt ist, erschien es ratsam, die Polysaccharid-O-Seitenketten des LPS-Moleküls davon zu isolieren.

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wies Pier (107) nochmals darauf hin, daß die Polysaccharid-O-Seitenketten auf einfache Weise vom toxischen Lipid A-Anteil abgetrennt werden könnten, wobei jedoch der daraus resultierende nichttoxische LPS-Bestandteil seine Immunogenität einbüßen würde. Er schlug deshalb vor, die Polysaccharid-O-Seitenketten an ein Carriermolekül zu binden, ein Weg, über den sich eine Wiedererlangung der Immunogenität herbeiführen ließe. Um das mit dem Gebrauch von LPS verbundene Problem der Toxizität zu überwinden, untersuchte Pier (107) deshalb die immunochemischen Eigenschaften einer hochmolekularen Polysaccharid-Präparation, die er sowohl aus dem die Bakterienzelle umgebenden Schleim als auch aus den Kulturüberständen der sieben Stämme des Fisher-Immunotypisierungsschemas gewinnen konnte. Dabei stellte sich heraus, daß die hochmolekulare Polysaccharidkette in beiden Fällen serologisch identisch mit der LPS-O-Seitenkette war. Unterschiede zwischen hochmolekularem Polysaccharid und O-Seitenketten fanden sich nur bezüglich der molekularen Größe und der Immunogenität bei Tieren (107). Damit konnte Pier frühere eigene Ergebnisse (103, 102), die befanden, daß hochmolekulares Polysaccharid Monosaccharid-Komponenten enthielte, die nicht in den LPS-O-Seitenketten-Präparationen gefunden werden konnten, widerlegen,

und somit in Anbetracht der gewonnenen Erkenntnisse den Besitz identischer Bestandteile bei hochmolekularen Polysacchariden und LPS-O-Seitenketten postulieren.

Wiederum von Pier et al. (104, 106) wurde auf die im Tiermodell nachgewiesene immunogene Wirksamkeit eines hochmolekularen Polysaccharides, welches von den Fisher Immuntypen 1, 2 und 3 stammte, hingewiesen. Vorrangig erwähnten die Autoren die Induzierung von Antikörpern, welche gegen eine intraperitoneal verursachte oder über Brandwunden entstandene Pseudomonas-Infektion schützten.

Neben dem Tiermodell wurden mit hochmolekularer Polysaccharid-Vaccine auch bereits Bestrebungen zur aktiven Immunisierung von Patienten unternommen. Am besten charakterisiert ist die Immunantwort auf Immuntyp-1-Polysaccharid. Pier (105) berichtete von der immunogenen Wirksamkeit dieses Antigens bei einer Dosierung von 100-250 µg und der dabei verursachten Bildung von bindenden und opsonierenden Antikörpern. Die im Vergleich zu den Impfstoffen auf LPS-Basis verminderten toxischen Nebenwirkungen bestanden im wesentlichen aus lokalen Schmerzen und Angspanntheit an der Injektionsstelle. Des weiteren ist zu betonen, daß diese Vaccine bei der Mehrzahl der mit ihr immunisierten Personen hauptsächlich die Bildung von Serotyp-spezifischen Antikörpern induzierte, und nur eine Minderheit der Patienten eine Kreuzimmunität gegen heterologe Serotypen von Pseudomonas aeruginosa aufbauten.

3.2.4.6 OEP ("Original Endotoxin Protein" bzw. "Common Protective Antigen") und Toxoid-Vaccinen

Abe und Homa (1) gelang es 1975, eine Proteinfraction aus Pseudomonas aeruginosa-Zellwandextrakten zu isolieren und zu charakterisieren. Sie bezeichneten das Protein, das normalerweise komplex an LPS gebunden in der Zellwand von

Pseudomonas aeruginosa vorliegt, als "Common Protective Antigen" bzw. "OEP".

"Common Antigen" nannten sie das Protein, da es sämtlichen 14 Serotypen des Homma-Typisierungsschemas (1) und allen sieben Immunotypen des Fisher-Schemas (33) gemeinsam ist. Das Molekulargewicht dieses kreuzreagierenden *Pseudomonas*-Proteins gaben sie mit 800 000 Daltons an.

Eine Untersuchung zur Beurteilung der Immunogenität und Schutzwirkung einer OEP-Vaccine führten Homma et al. (2) durch. Mit OEP immunisierte Mäuse wiesen einen Schutz gegen den nachfolgenden Challenge mit sämtlichen Serotypen des Homma- und Fisher-Typisierungsschemas auf.

Homma (55) erhöhte die immunisierende Potenz der OEP-Vaccine durch das Hinzufügen der Toxoide der *Pseudomonas*-Exotoxine Elastase und Protease. Diese beiden Toxine erwiesen sich aufgrund ihrer elastolytischen Aktivität als toxisch für verschiedene Gewebe (53) und sind daneben in der Lage, Plasmaproteine, wie Gerinnungs- und Komplementfaktoren, zu schädigen. Zur Bewertung der multikomponenten Vaccine, bestehend aus OEP und den Toxoiden von Elastase und Protease, verwendete Homma (55) als Modell eine durch *Pseudomonas aeruginosa* experimentell ausgelöste hämorrhagische Pneumonie bei Nerzen. OEP plus Toxoide erwies sich dabei als signifikant wirksamer in der Verhütung einer Pneumonie, herbeigeführt durch *Pseudomonas aeruginosa*, als die Immunisierung mit OEP-Vaccine alleine.

3.2.4.7 Polyvalente Vaccinen aus Zellwandextrakten:

PEV-01 und "Behring"-Vaccine

Neben der von Parke-Davis produzierten heptvalenten LPS-Vaccine "Pseudogen" stellt eine von Miler et al. (87) in den Wellcome-Forschungslaboratorien entwickelte Vaccine

"PEV-01" den am intensivsten in seiner Anwendung am Patienten erprobten Impfstoff dar.

PEV-01 wurde entsprechend zu Pseudogen aus der Zellwand von *Pseudomonas aeruginosa* extrahiert. Zu diesem Zweck wurde eine EDTA/Glycin-Mischung verwendet, mit deren Hilfe Bestandteile der Zellwand aller 16 im Jahre 1977 definierten Serotypen des IATS gewonnen wurden. Für die Impfstoffherstellung wurden vorzugsweise Pseudomonaden verwendet, die unter Bedingungen wuchsen, welche die Bildung von extrazellulären Toxinen verhinderten.

Jones, Roe und Gupta (119) führten von 1977 bis 1982 in Indien eine großangelegte Untersuchung über den Einsatz der PEV-01-Vaccine bei Patienten mit Verbrennungen von mehr als 15 % der Körperoberfläche durch. Die Autoren registrierten unter den Erwachsenen, durch die aktive Immunisierung mit der polyvalenten *Pseudomonas*-Vaccine PEV-01, eine Senkung der Mortalitätsrate von 42,9 % in der unbehandelten Kontrollgruppe auf 11,8 % in der Gruppe der Impflinge. Bei den Kindern wurde durch den Einsatz des Impfstoffes eine Verringerung der Mortalität von 28,0 % auf 10,75 % verzeichnet. Auffallend war die Beobachtung, daß sich die passive Übertragung von Immunglobulinen, welche aus Seren von mit PEV-01 vaccinierten freiwilligen Spendern gewonnen wurden, als besonders wirksam bei den Kindern erwies; die Mortalität konnte dadurch auf 5,6 % gesenkt werden.

PEV-01 zeigte sich weniger toxisch als die LPS-Vaccine Pseudogen, es wurden lediglich leichte Temperaturerhöhungen bei einigen der Probanden beobachtet.

Indessen waren die durch gramnegative Erreger verursachten Infektionen, die in der Kontrollgruppe auftraten, überwiegend durch Enterobakterien und nicht durch *Pseudomonas aeruginosa* bedingt (57).

Darüber hinaus wurde keine lokale Chemoprophylaxe bei der Versorgung der Brandwunden durchgeführt; daraus könnten

sich Unausgewogenheiten bei der Übertragung der registrierten Ergebnisse auf Verbrennungszentren ergeben, an denen eine aggressive lokale Unterdrückung von *Pseudomonas aeruginosa* zur Standardtherapie gehört.

Angefügt sollte noch werden das Fehlen genauer Informationen bezüglich der Natur, der Struktur, des relativen Gehaltes und der immunologischen Bedeutung der einzelnen Komponenten des Zellwandextrakt-Impfstoffes PEV-01.

Von einer polyvalenten *Pseudomonas*-Vaccine, die entsprechend dem PEV-01-Impfstoff gleichfalls aus Zellwandextrakten des Erregers besteht, berichteten Merle und Mitarbeiter der Behringwerke (85).

Diese Vaccine setzt sich aus Extrakten der 24 Stämme des Lanyi-Serotypisierungsschemas zusammen und besteht hauptsächlich aus LPS und Proteinen der äußeren Zellmembran. Sie erwies sich im Mäusemodell als wirksam gegen eine heterospezifische Belastung mit den 12 Stämmen des Habs-Serotypisierungsschemas.

Unterstrichen werden muß das Bestehen der Gefahr einer toxischen Wirkung der Behring-Vaccine durch den hohen Gehalt an LPS.

3.2.4.8 Protein-Vaccine

Die Zellumhüllung der gramnegativen Bakterien setzt sich aus zwei verschiedenen Schichten zusammen. Innen befindet sich die zytoplasmatische Membran, welche über eine Reihe von aktiven Transportmechanismen verfügt und als Syntheseort wichtiger Enzyme gilt.

Darauf folgt nach außen die eigentliche Zellwand. Ihr innerer Anteil, die sog. Murein- oder Peptidoglykanschicht, verleiht den Bakterien ihre Stabilität.

Noch weiter peripher liegt die äußere Membran, die sich aus Proteinen, Lipoproteinen und Lipopolysacchariden zu-

sammensetzt.

Seltmann (124) teilte die Proteine der äußeren Membran der gramnegativen Bakterien in Hauptproteine ("Major Proteins") und Nebenproteine ("Minor Proteins") ein. Die Unterscheidung bezieht sich nur auf die Menge, nicht die Bedeutung der Proteine.

Die Nebenproteine sind in Mengen von ca. 200-3000 Kopien pro Bakterienzelle vorhanden. Die Hauptproteine weisen dagegen eine Epitopdichte von mehr als 5000 Kopien pro Zelle auf.

Über die strukturelle und funktionelle Bedeutung der Membranproteine berichtete Dirienzo (24). Er wies den Protein-Protein-Wechselwirkungen einen wesentlichen Beitrag zur strukturellen Integrität der Zelle zu. So beruht, nach seiner Darstellung, die Verknüpfung der Peptidoglykanschicht mit der äußeren Membran entweder auf der kovalenten Bindung des Lipoproteins oder auf der Assoziation der Matrixproteine. Die äußere Membran setzt sich in diesem Modell aus zwei sehr ungleichen Schichten zusammen. Die innere Schicht enthält überwiegend Phospholipide und eingelagerte Lipoproteine, die äußere Schicht als auffälligste Komponente die Lipopolysaccharide, dazu auf- und eingelagerte Proteine (einschließlich der Transmembranproteine).

Der schematische Aufbau einer gramnegativen Bakterienzellwand ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Mizuno gelang es 1979 nachzuweisen (88), daß die äußere Zellmembran von *Pseudomonas aeruginosa* wenigstens sechs Hauptproteine enthält. Zur näheren Charakterisierung der Proteine führte er ein Benennungsschema ein, wobei er für die Bezeichnung der Proteine die Buchstaben D, E, F, G, H und J einführte. Hancock und Carey (43) erweiterten dieses Nomenklaturschema durch eine weitergehende Unterteilung der Proteine D und H in D_1 , D_2 bzw. H_1 und H_2 .

Eine möglicherweise enge Beziehung zur äußeren Membran der

Enterobakterien zog bereits Nakamura in Erwägung. Er fand heraus, daß *Pseudomonas aeruginosa* äußere Membranproteine enthält, die bestimmten Proteinen in der äußeren Zellmembran von Enterobakterien, wie z.B. *Escherichia coli*, entsprechen. Er machte dabei zum einen auf das Hitze-modifizierbare Protein ("Heat-Modifiable-Protein") (92) aufmerksam, worunter man ein Protein versteht, das eine Änderung seiner elektrophoretischen Mobilität anlässlich der SDS-PAGE in Abhängigkeit von der verwendeten Temperatur für das SDS-Lösungsmittel erfährt. Daneben wurde ein Peptidoglykan-assoziiertes Protein ("Peptidoglycan-Associated Protein") (49) beschrieben, womit zum Ausdruck kommen soll, daß es eng mit der Peptidoglykanschicht verbunden vorliegt. Analog zum Braunschen Lipoprotein von *Escherichia coli* fand man in der äußeren Membran von *Pseudomonas aeruginosa* ebenfalls Lipoproteine vor.

Diese Beobachtungen lassen auf ein möglicherweise einheitliches Konzept bezüglich Struktur und Zusammensetzung der äußeren Membran der gramnegativen Bakterien schließen.

Das Ziel der Aufdeckung von Aufbau und Beschaffenheit der äußeren Zellmembran von *Pseudomonas aeruginosa* war daraufhin abgesteckt, einen Strukturbestandteil für die Verwendung als wirksame antigene Determinante im Rahmen einer immunologischen Beeinflussung der *Pseudomonas*-Infektionen zu isolieren.

Dementsprechend wurde eine Anzahl von Vaccinen entwickelt (98), von denen die meisten auf der Basis von LPS hergestellt wurden. Diese Impfstoffe haben jedoch den Nachteil einer relativ hohen Nebenwirkungsinzidenz aufgrund ihrer Toxizität. Ein weiterer Nachteil ist die Erfordernis einer Mischung von LPS-Antigenen, da LPS-Vaccinen nur gegen den homologen Serotyp eine Immunantwort hervorrufen, und mittlerweile 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben sind.

Ein entscheidender Schritt in Richtung Membranprotein-

Vaccine gelang Mutharia und Hancock (90). Sie zeigten, daß alle Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* ein gemeinsames äußeres Zellmembranproteinmuster besitzen, welches aus den drei Proteinen F, H₂ und J besteht. Damit war zum ersten Male ein für alle Serotypen gemeinsames Antigen definiert.

Membranprotein F wurde von Yoshimura (131) als ein durch Hitze modifizierbares, dem Stofftransport des Bakteriums dienendes, porenbildendes Protein bzw. "Porin" definiert. Es findet sich bei der SDS-PAGE doppelbandig im Bereich von 35 bzw. 37 kD, liegt in einer Epitopdichte von 1×10^5 bis 3×10^5 Kopien pro Zelle vor und bildet den Hauptkanal für hydrophile Substanzen durch die Bakterienzellmembran (94). Von Hancock (43) wurde für die Lipoproteine H₂ und J ein Molekulargewicht von 21 bzw. 14 kD definiert.

In jüngster Zeit wurde mehrfach auf die Möglichkeit hingewiesen, äußere Membranproteine von gramnegativen Bakterien als Vaccine zu verwenden (135).

Gilleland (38) immunisierte Mäuse mit einer Vaccine, bestehend aus isoliertem Membranprotein F, und erzielte damit eine Schutzwirkung gegen eine Infektion mit zwei heterologen Serotypen.

Zu Beginn des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit waren jedoch keine Ergebnisse bekannt, ob eine Immunisierung mit den Proteinen F, H₂ und J eine Schutzwirkung gegen alle bekannten Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* aufweist.

Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob eine Zellmembran-Vaccine, bestehend aus den äußeren Membranproteinen F, H₂ und J, eine Kreuzimmunität gegen alle bekannten 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* aufbaut.

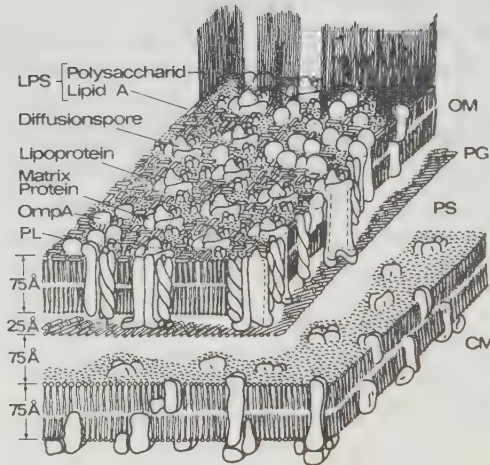


Abb. 1: Modell der gramnegativen Zellwand nach Dirienzo
OM = Äußere Zellmembran, PG = Peptidoglykan-
schicht, PS = Periplasmatischer Spalt, CM = Zyto-
plasmamembran

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1 Bakterien

Die 19 Serotypen für den Schutzversuch wurden von Prof. Dr. Bauernfeind, Max von Pettenkofer Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt.

Serotyp 12, der für die Proteinisolierung Verwendung fand, stammte aus dem Trachealsekret eines an einer Pseudomonas-Pneumonie verstorbenen Patienten der anästhesiologischen Intensivstation des Klinikums Großhadern.

Die Typisierung erfolgte durch Prof. Dr. Bauernfeind.

Die Anzüchtung der Bakterien geschah auf Trypticase-Soy-Agar oder in Trypticase-Soy-Bouillon (BBL) unter ständiger Durchmischung für 18 Stunden bei 37°C.

1.2 Versuchstiere

Aus dem Zentralinstitut für Versuchstierkunde in Hannover wurden weibliche Balb/c-Mäuse, zwischen 6 und 8 Wochen alt, bezogen. Die Tiere wiesen zu Versuchsbeginn ein Körpergewicht von 17 g bis 20 g auf. Sie wurden in Makrolon-Käfigen mit Sägespänen als Einstreu in Gruppen von 6-8 Tieren gehalten. Ihnen stand als Futter kommerzielle Versuchstierdiät in Form von Pellets sowie Wasser ad libitum zur Verfügung.

Haltung und Fütterung war die gleiche bei Impflingen und Kontrolltieren.

1.3.1 Herstellung der Zellmembran-Vaccine

Die Isolierung der Membranproteine F, H₂ und J erfolgte mittels Detergentien-Extraktion nach einer modifizierten Methode von Mizuno et al. (88).

Zu diesem Zweck wurde der Erreger 18 Stunden lang, bis zum Erreichen der log-Phase, angezüchtet und anschließend durch Zentrifugation bei 1500 g von seinem Nährmedium abgetrennt. Das Naßgewicht des bakteriellen Niederschlages wurde bestimmt. Nach Suspendierung der Bakterien in 10 mM Natriumphosphat-Aufschlußpuffer wurde der Keim durch Ultraschall (4 mal 5 min, bei 90 Watt) inaktiviert. Verwendet wurde hierfür ein Branson Sonifier B 12. Der dabei gewonnene Überstand wurde mit Natriumphosphat-Aufschlußpuffer versetzt und bei 100 000 g und 4°C zentrifugiert. Hierzu wurde eine Ultrazentrifuge TGA-65 der Firma Kontron benutzt.

Der erhaltene Niederschlag wurde anschließend zweimal mit Aufschlußpuffer bei 100 000 g und 4°C für je 1 Stunde gewaschen. Vom Niederschlag wurde die erste Probe (Gel a) für die Kontrolle der einzelnen Schritte der Präparation mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lugtenberg (78) entnommen.

Pro 1 g Naßgewicht von *Pseudomonas aeruginosa* wurde dem Niederschlag anschließend 2,66 ml SDS-Extraktionspuffer zugegeben, homogenisiert und bei 30°C für 1 Stunde gerührt. Danach wurde die Suspension bei 100 000 g und 4°C für 1 Stunde zentrifugiert, der erhaltene Niederschlag nochmals mit der halben Menge SDS-Puffer extrahiert und erneut zentrifugiert. Nach Entnahme der zweiten Probe (Gel b) für die elektrophoretische Kontrolle wurde der Niederschlag dieser Zentrifugation mit SDS-NaCl-Extraktionspuffer versetzt und homogenisiert, bei 30°C für 1 Stunde gerührt und bei 100 000 g und 25°C für 1 Stunde zentrifugiert. Abschließend wurde der unlösliche Anteil

dieses Präparationsschrittes zweimal bei 100 000 g und 4°C je 1 Stunde mit Aqua dest. gewaschen.

Der gewonnene Niederschlag wurde in 5 ml Aqua dest. aufgelöst, und davon die dritte Probe (Gel d) für die Kontrolle der Extraktion entnommen.

Der Proteingehalt des jeweiligen Extraktionsendproduktes wurde durch eine Proteinbestimmung nach Lowry (77) festgestellt.

1.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese diente der qualitativen Auftrennung der Membranproteine, wobei als Referenz für die Molekulargewichte ein kalibrierter Kit der Firma Pharmacia Fine Chemicals mit einer Bandbreite von 14 400 (α -Lactalbumin) bis 94 000 (Phosphorylase b) Daltons diente.

Die qualitative Protein-Auftrennung der verschiedenen Proben der Membranprotein-Extraktion wurde auf Gelen mit unterschiedlichem Gehalt an SDS durchgeführt. Die Gele wurden jeweils zwischen zwei Glasplatten gegossen, deren Abstand 25 mm betrug. Das Stacking-Gel wies eine SDS-Konzentration von 0,1 % auf, das darunterliegende Running-Gel, für die eigentliche Proteinauftrennung, enthielt 0,2 % SDS.

Nach Einsetzen der Gelplatten in die mit Elektrodenpuffer (pH 7,47) gefüllte Elektrophorese-Kammer ließ man das Gel bei 150 V, 4,5 mA, für eine Stunde vorlaufen. Daraufhin erfolgte das Auftragen der Proteinproben. Diese wurden in Probenpuffer (pH 6,8) gelöst und in die Auftragstellen pipettiert, wobei der Proteingehalt der Proben zwischen 30-50 μ g/ml betrug. Dies wurde durch eine quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (77) ermittelt. Anschließend ließ man die Proben bei 80 V und 20 mA für ca. 10 min einziehen, bevor die eigentliche Elektrophorese bei 200 V für

2-3 Stunden durchgeführt wurde.

Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Gele zur Darstellung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

1.4 Aktive Immunisierung

1.4.1 Vorversuche

1.4.1.1 Prüfung der Vaccine auf Unschädlichkeit und Ermittlung der optimalen Impfstoffmenge

Gruppen von 6 Mäusen wurden jeweils mit Vaccine-Dosen von 10, 25, 50 bzw. 100 µg des Membranproteingemisches immunisiert. Nach 14 Tagen wurden die Tiere mit der gleichen Impfstoffmenge revacciniert, und nach Verlauf einer weiteren Woche erfolgte bei jedem Einzeltier eine Bestimmung des Gehaltes an Serumantikörpern mittels ELISA.

1.4.1.2 Auswirkung verschiedener Adjuvantien und Appli- kationsformen auf die Immunantwort

Hierzu wurde die Vaccine in einer Dosierung von 100 µg des Membranproteingemisches Gruppen von 5 Mäusen intramuskulär, interperitoneal bzw. subcutan unter Verwendung von $\text{Al}(\text{OH})_3$ als Adjuvans appliziert. Einer Gruppe mit 5 Tieren wurden je 100 µg Membranproteingemisch in CFA intraperitoneal verabreicht. Zwei Wochen nach der Erstimpfung wurden die Tiere auf die entsprechende Art und Weise revacciniert. Nach Ablauf einer weiteren Woche wurden die Seren der Einzeltiere auf ihren Antikörpergehalt mittels ELISA untersucht.

1.4.2 Immunisierungsschema

Gruppen von 6-8 Mäusen wurden intraperitoneal mit einer Vaccinedosis von jeweils 50 µg eines Gemisches der äußeren Membranproteine F, H₂ und J (80 µl), suspendiert in 3 % Al(OH)₃ (20 µl), immunisiert. Das Impfstoffvolumen betrug somit jeweils 100 µl.

Die Al(OH)₃-Suspension wurde von den Behringwerken, Marburg, zur Verfügung gestellt.

Die Kontrolltiere erhielten 3 % Al(OH)₃ ohne Antigen, in 100 µl physiologischer NaCl-Lösung suspendiert.

Am Tag 14 wurden die Tiere mit der gleichen Dosis revacciniert. Vier Tage nach der Booster-Impfung wurde den Tieren Blut aus der Schwanzvene entnommen und die Serumantikörper gegen *Pseudomonas aeruginosa* bestimmt.

1.4.3 Verlauf des Antikörpertiters über mehrere Monate

Eine Gruppe von 6 Mäusen wurde nach dem oben beschriebenen Schema immunisiert. Eine Kontrollgruppe erhielt nur 3 % Al(OH)₃ ohne Antigen. Den Einzeltieren wurde im Abstand von 2-3 Wochen über einen Zeitraum von 3 Monaten Blut aus der Schwanzvene entnommen, das Serum tiefgefroren und nach Beendigung des Versuches auf seinen Antikörpergehalt gegen *Pseudomonas aeruginosa* untersucht.

1.5 Bestimmung der Antikörpertiter

1.5.1 Enzyme-linked-immunosorbent-assays (ELISA)

Die Antikörpertiter von Impfungen sowie von Kontrolltieren wurden durch ELISA bestimmt.

Mikrotiterplatten der Firma Dynatech, Plochingen, aus Polyvinylchlorid, mit 96 Vertiefungen, wurden mit 100 μ l *Pseudomonas aeruginosa*-Sonikat (1:200 verdünnt mit PBS) des jeweiligen Serotyps (4,5 μ g/ml) beschichtet und 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 1 Stunde bei 37°C mit phosphatgepuffertem fötalem Kälberserum abgesättigt. Nach erneutem Waschen wurden die Platten bei -20°C aufbewahrt.

Von den zu untersuchenden Serumverdünnungen (Verdünnungsstufen 1:50 bis 1:6400) wurden 50 μ l pro Vertiefung der mit Antigen beschichteten Mikrotiterplatte aufgetragen. Als negatives Kontrollserum wurden Serumverdünnungen (1:10¹ bis 1:10³) von nicht immunisierten Kontrolltieren aufgetragen. Serumverdünnungen (1:200 bis 1:25600) von viermal immunisierten Mäusen dienten als positive Kontrolle. Nach 60 min Inkubation bei 37°C wurde gewaschen und 50 μ l Peroxydase-konjugiertes anti-Maus-F(ab')₂, 1:500 verdünnt, zugegeben. Anschließend wurde erneut 60 min bei 37°C inkubiert, und daraufhin nach dreimaligem Waschen 50 μ l Substrat, O-Phenylendiamin (0,2 % OPD, 0,015 % H₂O₂), zugegeben. Nach 30 min bei 37°C Inkubation wurde die Reaktion mit 50 μ l 4,5 M H₂SO₄ gestoppt, und die Extinktion bei 450 nm mit einem ELISA-Auswertgerät MR 580 der Firma Dynatech bestimmt.

Alle Reagenzien für ELISA wurden als Kit (NEI-601) von der Firma New England Nuclear (NEN), Dreieich, bezogen.

1.5.1.1 Bestimmung der Immunglobulinklassen bzw. -subklassen

Die quantitative Bestimmung der Immunglobulinklassen bzw. -subklassen im Antiserum erfolgte gleichfalls mittels ELISA, wobei zusätzlich ein Set von kommerziell hergestell-

ten, klassen- bzw. subklassenspezifischen Kaninchen anti-Maus-Immunglobulinen verwendet wurde.

Dazu wurden Mikrotiterplatten mit *Pseudomonas aeruginosa*-Sonikat (1:2000 verdünnt) beschichtet. Das Serum einer immunisierten Maus wurde in zwei Verdünnungen (1:500 bzw. 1:1000) aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und Waschen wurden pro Vertiefung 50 µl Kaninchen anti-Maus-Immunglobuline aufgetragen. Diese waren spezifisch gegen Mäuse-Immunglobulin IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA und IgM gerichtet. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und Waschen wurden in jede Vertiefung 50 µl Peroxydase-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) zugegeben.

Die folgenden Schritte entsprachen den unter 1.5.1 geschilderten Vorgängen.

Die klassen- bzw. subklassenspezifischen Kaninchen-anti-Maus-Immunglobuline wurden als Kit (MonoAb-ID EIA) von der Firma Zymed Laboratories bezogen.

1.5.2 Immunfluoreszenzmessungen

Zur Bestimmung der Immunfluoreszenztiter gegen alle 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* wurden Objektträger (25 x 75 mm) mit 24 Vertiefungen der Firma Hölzl, Dorfen, mit der entsprechenden Antigensuspension (intakten *Pseudomonas aeruginosa* Organismen) beschichtet und luftgetrocknet.

Die Testseren von immunisierten Mäusen wurden 1:16 vorverdünnt und anschließend in zweifach Verdünnungsschritten bis 1:10000 verdünnt. 10 µl der jeweiligen Verdünnung wurden pro Vertiefung des Objektträgers aufgetragen und 30 min bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Dann wurde kurz mit Phosphatpuffer gespült und anschließend 10 min in dem gleichen Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

dem Herausnehmen aus dem Pufferbad wurden die Objektträger kurz getrocknet und 10 µl Fluorescein-markiertes Ziege anti-Maus Immunglobulin (Firma Nordic) pro Vertiefung zugegeben. Nach Inkubation, Waschen und Trocknen wie zuvor wurde die Fluoreszenzintensität mit einem Leitz Ortholux II Fluoreszenzmikroskop abgelesen.

Der Immunfluoreszenztiter des Serums entspricht dem Kehrwert der höchsten Verdünnung mit 50 % positiver Fluoreszenz.

1.5.3 Western Immunoblotting

Hierzu wurden durch Ultraschall desintegrierte Membranfraktionen aller 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Anschließend wurden die Proteine nach der Methode von Towbin et al. (127) auf Nitrozelluloseblätter transferiert. Das Blotten erfolgte in einer Blotting-Apparatur der Firma LKB, Grärfelfing, bei 4°C und 1 A in 1 Stunde. Die Nitrozellulosefolien wurden nach dem Blotten über Nacht mit 10 % Serumalbumin, Ria Grade (Firma Sigma, Taufkirchen), abgesättigt und nach 1 Stunde Waschen mit 0,9 % NaCl-Lösung mit dem Serum der mit Membranprotein-Vaccine immunisierten Mäuse für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Daraufhin wurde dreimal mit je 10 µl 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und hinterher mit 50 µl ¹²⁵J-markiertem Protein A (9 µCi/µg, New England Nuclear/Nex 146 L) in 10 ml 3 %igem Serumalbumin über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0,9 % NaCl-Lösung wurde die Nitrozellulose getrocknet und ein Röntgenfilm der Firma Agfa Gaevert für 4 Stunden bei -70°C mit dem Gel exponiert und anschließend entwickelt.

1.6 Schutzversuch

Gruppen von 6-8 Impflingen, welche 10 Tage vorher zum zweiten Male mit der Membranprotein-Vaccine immunisiert worden waren, und gleichgroße Gruppen von Kontrolltieren wurden mit 200 μ l *Pseudomonas aeruginosa* Keimsuspension intraperitoneal infiziert. Der Keimgehalt lag pro applizierter Dosis zwischen 10^9 und 10^6 lebenden Organismen.

Die jeweils für den Challenge vorgesehenen Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* wurden nach dem Anzüchten über Nacht (ca. 18-20 Stunden) in TS-Bouillon bei 1500 g für 10 min zentrifugiert und in steriler 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert. Von dieser Keimsuspension wurde jeweils eine Probe entnommen und in einer Verdünnungsreihe ($1:10^6$ und $1:10^7$) auf Blutagarplatten ausgestrichen. Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37°C wurden die Kolonien gezählt und als Keimdosis angegeben. Von diesem Wert ausgehend, wurde eine weitere Verdünnungsreihe für den Challengeversuch hergestellt, wobei der Keimgehalt pro Infektionsdosis zwischen 10^9 und 10^6 lebenden *Pseudomonas aeruginosa* Organismen eingestellt wurde. Nach der Infektion wurden die Tiere eine Woche lang beobachtet, und der Anteil der Überlebenden sowohl in der Impfgruppe als auch bei den Kontrolltieren aufgezeichnet.

Die statistische Signifikanz der unterschiedlichen Überlebensraten zwischen Kontrollen und geimpften Tieren wurde am Rechenzentrum für die Medizinische Fakultät der Universität München anhand von Kontingenztafeln berechnet. Als weiteres Bewertungskriterium für den aktiven Schutzversuch diente die Berechnung der 50 % Überlebensdosis (LD_{50}) nach dem Verfahren von Spearman-Kärber (126).

1.7 Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen wurden von PD Dr. Per-
manetter vom Pathologischen Institut der Universität Mün-
chen durchgeführt. Dazu wurden Impflingen und Kontroll-
tieren nach erfolgter Infektion mit *Pseudomonas aerugino-*
sa die inneren Organe entnommen und in 10 % Formalin fi-
xiert.

2. Ergebnisse

2.1 Anzüchtung der Bakterien

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung des Impfstoffes gegen *Pseudomonas aeruginosa* wurde für jede Einzelpräparation ein klinisches Isolat von Serotyp 12 in 3 Liter TS-Bouillon (Trypticase Soy Broth-BBL Microbiology Systems, Becton Dickinson and Co.) angezüchtet.

Die nach Abzentrifugieren bei 1500 g erhaltenen bakteriellen Niederschläge wiesen ein Naßgewicht zwischen 16,49 g und 24,77 g auf.

Die einmalige Abwandlung des verwendeten Anzüchtungsmodus, wobei der Nährbouillon zusätzlicher Sauerstoff über eine elektrische Belüftungspumpe zugeführt wurde, führte lediglich zu einer geringgradigen Erhöhung des Naßgewichtes auf 26,35 g, woraufhin die Anzüchtung der Bakterien wieder ohne zusätzliche Belüftung erfolgte.

2.2 Isolierung der Membranproteine F, H₂ und J

Nach acht Zentrifugationsschritten, unter Verwendung von SDS-Extraktionspuffern mit ansteigendem Salzgehalt, wurden die nahezu reinen äußeren Zellmembranproteine F, H₂ und J gewonnen.

Nach den ersten zwei Extraktionsschritten mit 2 % Natrium-Dodecyl-sulfat wurden, wie von Mizuno et al. (88) beschrieben, vor allem die Proteine F und H₂ erhalten. Die Hauptmenge an Protein J blieb im löslichen Überstand nach der ersten Extraktion zurück. Ein geringer Anteil an Protein J wurde jedoch zusammen mit Protein F und H₂ präzipitiert und konnte somit Bestandteil der Vaccine bilden.

Abb. 2 zeigt das Ergebnis der SDS-Polyacrylamid-Gelelek-

trophorese der aufeinanderfolgenden Schritte der Extraktion der Membranproteine.

Die pro Extraktion erhaltene Menge an isolierten Membranproteinen F, H₂ und J konnte im Laufe der Zeit von anfangs ca. 14 mg auf maximal 37,73 mg pro Einzelextraktion gesteigert werden.

Als Ursache hierfür können eine Verfeinerung der Arbeitsmethoden und eine Verringerung der Substanzverluste zwischen den einzelnen Präparationsschritten angesehen werden.

Zu Beginn des Schutzversuches wurden die Einzelextraktionsmengen gepoolt, woraufhin ein Impfstoffvorrat von 34 ml Membranproteingemisch mit einer Konzentration an Protein F, H₂ und J von je 5,6 mg/ml zur Verfügung stand.

2.3 Vorversuche zur Optimierung der Impfmethode

Mit einer Vaccinedosis von 50 µg des Membranproteingemisches/Tier wurde bei einer Serumverdünnungsstufe von 1:1600 eine durchschnittliche Bindung von 24 % (+ 11) erzielt. Der Prozentsatz gibt den durch die Vaccine bewirkten Antikörpergehalt des Testserums in Form des erreichten Anteils am Bindungsvermögen eines hochtitrigen Standardserums wieder. Letzteres wurde durch die viermalige Immunisierung von Mäusen mit der Membranprotein-Vaccine erhalten.

Da, wie auf Abb. 3 sichtbar, bei Verabreichung der doppelten Vaccinedosis (100 µg/Tier) nur eine Steigerung der sekundären Immunantwort um 2 % auf 26 % Bindungsvermögen erreicht werden konnte, wurde in Anbetracht des aufwendig hergestellten und nur in begrenzter Menge zur Verfügung stehenden Vorrates an gereinigten Membranproteinen für den Hauptversuch eine Vaccinedosis von 50 µg Antigengehalt pro Injektion verwendet.

Abb. 4 zeigt das Ergebnis eines weiteren Vorversuches. Bei Verwendung von $\text{Al}(\text{OH})_3$ als Adjuvans und intraperitonealer Applikation des Impfstoffes wurde ein Antikörpergehalt in Höhe von 40,88 % ($\pm$ 12,03) Anteil am Bindungsvermögen des Standardserums erzielt. Die erreichten Werte bei Kombination von $\text{Al}(\text{OH})_3$ mit subcutaner und intramuskulärer Applikationsweise bzw. bei Verwendung von CFA und intraperitonealer Injektionstechnik liegen mit Mittelwerten von 23,40 % und 23,45 % bzw. 25,17 % erheblich darunter. Die in beiden Vorversuchen ermittelten Unterschiede der Werte weisen jedoch keine statistische Signifikanz auf.

2.4 Verlauf des Antikörpertiters

Ein Serumpool, bestehend aus den Antiseren von sechs immunisierten Einzeltieren, wies über den Zeitraum von 119 Tagen (beginnend mit dem Tag der Erst-Impfung) eine Abnahme des Antikörpertiters von 60 % auf 34 % Bindungsvermögen auf (Abb. 5).

Der Verlauf des Titers von vier Einzeltieren über den Zeitraum von 61 Tagen ist auf Abb. 6 wiedergegeben. Anlässlich der ersten Blutentnahme, welche 43 Tage nach der Booster-Impfung erfolgte, wurden Werte von maximal 73 % bis minimal 42 % Bindungsvermögen pro Einzeltier gemessen.

Bei der vierten Blutentnahme (durchgeführt 61 Tage später bzw. 119 Tage nach der Erst-Impfung) wurde eine Verringerung des Serumantikörpergehaltes auf Werte zwischen 44 % und 34 % Bindungsvermögen je Einzeltier registriert.

Das Serum eines nicht immunisierten Kontrolltieres wies über den entsprechenden Versuchszeitraum einen Antikörpertiter mit Werten zwischen 11 % und 17 % Bindungsvermögen auf.

2.5 Immunogenität der Vaccine

Die Fragestellung, ob eine Membranprotein-Vaccine, bestehend aus den Proteinen F, H₂ und J, isoliert aus *Pseudomonas aeruginosa*-Serotyp 12, in der Lage ist, Antikörper zu induzieren, die mit allen Serotypen kreuzreagieren, wurde durch drei verschiedene Experimente untersucht:

2.5.1 Messung der Antikörpertiter von immunisierten Mäusen mittels ELISA

Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, wurden nach zweimaliger Impfung mit der Membranprotein-Vaccine Serumantikörper gegen alle 19 Serotypen gebildet. Die Titer sind als Prozentwert des Bindungsvermögens eines hochtitrigen Standardserums angegeben und betragen bis zu 36 % bei Serotyp 06.

Nach durchlaufener Infektion mit Serotyp 02 stiegen die Titer gegenüber allen Serotypen an und erreichten Werte bis zu 80 % bei Serotyp 17.

2.5.2 Messung der Antikörpertiter durch Immunfluoreszenz

Die Fluoreszenztiter sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Wie in "Material und Methoden" beschrieben, wurden intakte *Pseudomonas aeruginosa*-Organismen der Serotypen 01-19 mit dem Serum einer zweimal vaccinierten Maus inkubiert, und die Bindung von anti-*Pseudomonas*-Antikörpern mit Fluorescein konjugiertem anti-Maus-Immunglobulin gemessen.

Gegenüber allen 19 Serotypen wurden Antikörpertiter bis maximal 1:4096 gemessen, was in Gruppe I wiedergegeben ist.

Nach durchlaufener Infektion mit dem Serotyp 05 stiegen diese Titer gegenüber fast allen Serotypen um bis zu drei Titerstufen an (Gruppe II).

Das Serum einer nicht immunisierten Kontrollmaus zeigte nur bis zu einer Titerstufe von 1:8 positive Reaktion (Fluoreszenz).

Die Fluoreszenztiter sind als Kehrwert der höchsten Serumverdünnung angegeben, bei der mindestens 50 % der Organismen noch positive Fluoreszenz zeigten.

2.5.3 Nachweis der Antikörper durch Western Immunoblots

Auch die Ergebnisse der Immunoblots zeigen, daß durch Immunisierung mit der Membranprotein-Vaccine, bestehend aus den Proteinen F, H₂ und J, Antikörper induziert wurden, die mit allen Serotypen des Erregers kreuzreagieren (Abb. 7).

Nach elektrophoretischer Auftrennung des Sonikates des jeweiligen Serotyps und Übertragen auf Nitrozellulose wurden nach Inkubation mit dem Serum vacciniertter Mäuse und anschließendem Immunglobulin-Bindungsnachweis mit ¹²⁵J-Protein A bei allen Serotypen die Proteine F, H₂ und J bei der anschließenden Autoradiographie sichtbar.

2.5.4 Bestimmung der Immunglobulinklassen bzw. -subklassen

Die quantitative Analyse des Serums einer immunisierten Maus auf seine gegen *Pseudomonas aeruginosa* gerichteten Antikörperfraktionen durch ELISA unter Verwendung von Immunglobulinklassen- bzw. -subklassen-spezifischen Kaninchen anti-Maus-Immunglobulinen ergab bei einer Verdün-

nung des Antiserums von 1:1000 einen Gehalt an IgG von ca. 80 % (IgG1: 6 %, IgG2a: 30 %, IgG2b: 23 %, IgG3: 20 %); der Anteil von IgM betrug 17 % und der von IgA lag bei 4 %.

2.6 Schutzversuch

Die Abb. 8 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Schutzversuches. Gruppen von je sechs immunisierten Mäusen bzw. von sechs Kontrolltieren wurden mit Keimdosen zwischen 5×10^6 und 1×10^9 lebenden *Pseudomonas aeruginosa* Organismen des Serotyps 01 intraperitoneal belastet.

In der Kontrollgruppe töteten 5×10^7 Erreger 90 % der Mäuse innerhalb des ersten Tages. In der Gruppe der Impflinge verursachte erst eine zehnfach höhere Keimmenge das gleiche Ergebnis. Sogar bei einer Belastung mit 1×10^8 lebenden Keimen wurde in der Impfgruppe eine Überlebensrate von 100 % beobachtet.

Die gleichen Ergebnisse zeigt die Abb. 9, wobei hier die Überlebensrate gegen eine ansteigende Belastungsdosis aufgetragen ist. Man kann hier eine Verschiebung der LD_{50} von $2,17 \times 10^7$ in der Kontrollgruppe nach $2,1 \times 10^8$ in der Impfgruppe beobachten.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Schutzversuche mit allen bekannten 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* zeigt die Tabelle 3. Die nach dem Verfahren von Spearman-Kärber (126) berechnete LD_{50} für Impflinge und Kontrollen war für alle Serotypen signifikant zugunsten höherer Keimzahlen für die immunisierten Gruppen verschoben.

Das Verhältnis der mittleren letalen Dosis LD_{50} (ΔLD_{50}) der Impfgruppen und Kontrollen zueinander beträgt maximal 26, minimal 2.

Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse mittels Kontingenztafeln (Chi-Quadrat-Test) ergab für jeden der getesteten Serotypen einen signifikanten Unterschied zwischen geimpften Tieren und Kontrollen.

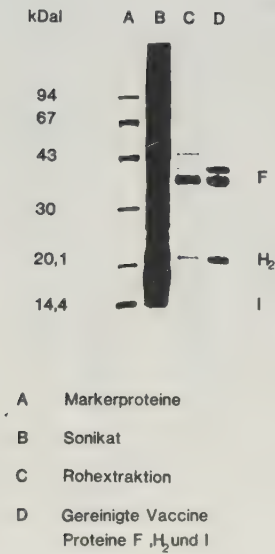


Abb. 2: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der einzelnen Reinigungsschritte von Protein F, H₂ und J aus *Pseudomonas aeruginosa* Serotyp 12 Membranpräparation

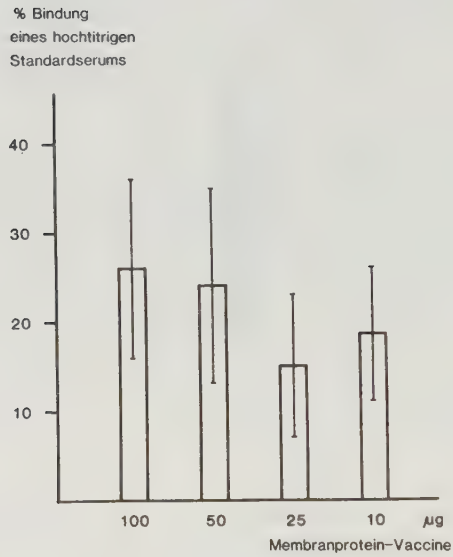


Abb. 3: Auswirkung verschiedener Vaccine-Dosen auf die sekundäre Immunantwort gegen *Pseudomonas aeruginosa*

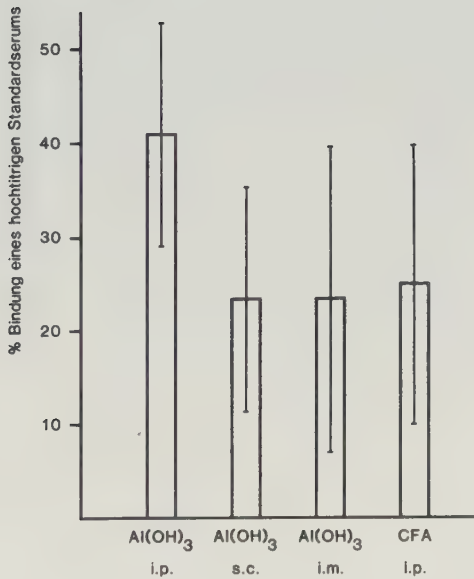


Abb. 4: Auswirkung verschiedener Adjuvantien und Applikationsformen auf die sekundäre Immunantwort gegen *Pseudomonas aeruginosa*

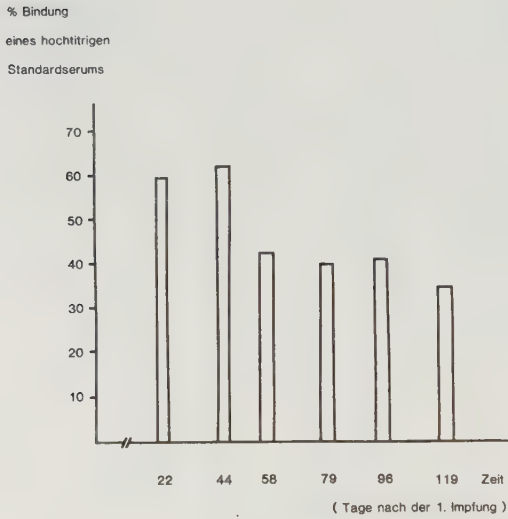


Abb. 5: Verlauf des Antikörpertiters in einem Serum-
pool, gebildet aus den Einzelseren von sechs
mit Membranprotein-Vaccine immunisierten Mäu-
sen

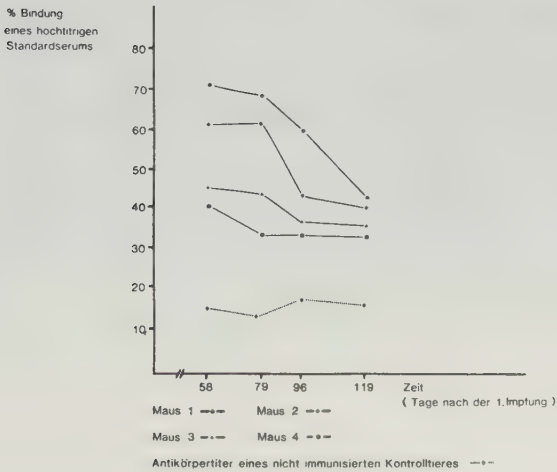


Abb. 6: Verlauf des Antikörpertiters von vier mit Membranprotein-Vaccine immunisierten Einzeltieren über den Zeitraum von 61 Tagen

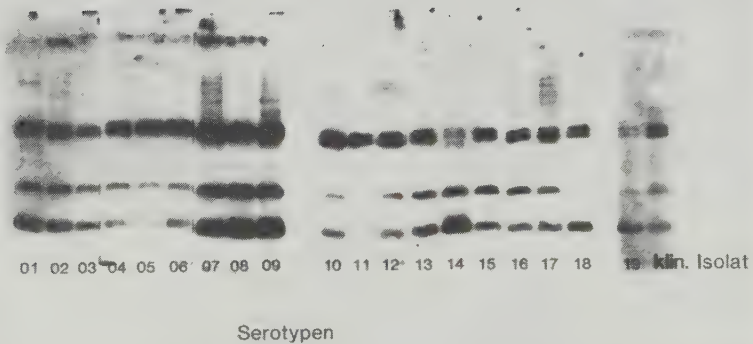


Abb. 7: Immunoblots der Serotypen 1-19 von *Pseudomonas aeruginosa* und eines klinischen Isolates. Membranpräparationen der entsprechenden Serotypen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrocellulosefolie übertragen. Die Nitrocellulosestreifen wurden anschließend mit dem Serum einer mit den Membranproteinen F, H₂ und J immunisierten Maus inkubiert und die Bindung der Immunglobuline mit ¹²⁵J-Protein A und Autoradiographie sichtbar gemacht

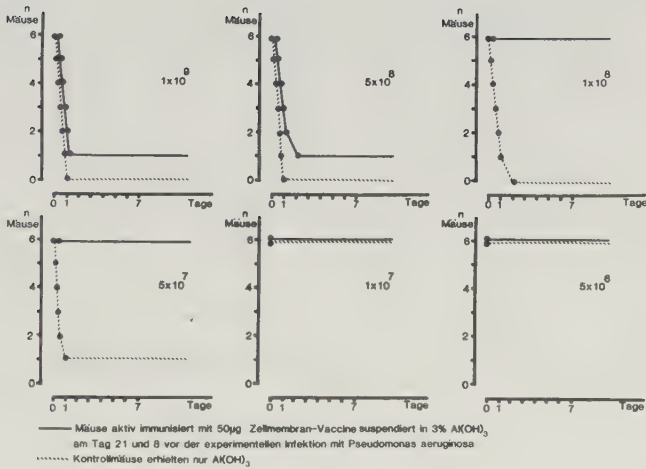


Abb. 8: Überlebensrate von Balb/c-Mäusen nach experimenteller Infektion mit Serotyp 1 von *Pseudomonas aeruginosa*

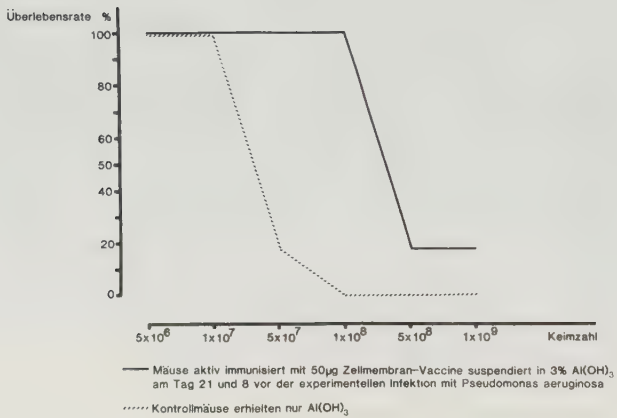


Abb. 9: Überlebensrate von Balb/c-Mäusen nach experimenteller Infektion mit verschiedenen Keimdosen von *Pseudomonas aeruginosa* Serotyp 1

Serotyp	Elisatiter vor Infektion	Elisatiter nach Infektion
	(% eines hochtitrigen Standardserums)	(% eines hochtitrigen Standardserums)
1	24	50
2	30	94
3	10	20
4	19	46
5	31	70
6	36	70
7	26	70
8	22	63
9	23	45
10	27	57
11	20	44
12	22	74
13	22	72
14	14	67
15	20	63
16	20	48
17	28	80
18	17	69
19	20	65
Clin. isol. M. (St.12)	15	66

Tab. 1: Serum-Antikörpertiter von Mäusen, immunisiert mit äußerer Membranprotein-Vaccine, gegen die Serotypen 1-19 von *Pseudomonas aeruginosa*, gemessen durch ELISA, vor und nach experimenteller Infektion mit Serotyp 2. Die Titer sind als Prozentwert eines hochtitrigen Standardserums angegeben. Der Mittelwert des Antikörpertiters nach durchlaufender Infektion betrug 61.42 %, bei einer Standardabweichung von ± 16.43

	ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	ST 5	ST 6	ST 7
I	1: 512	1: 512	1:1024	1:1024	1:1024	1:4096	1:2048
II	1:1024	1: 128	1:4096	1:4096	1:4096	1:8192	1:4096

	ST 8	ST 9	ST 10	ST 11	ST 12	ST 13	ST 14
I	1: 512	1:1024	1: 512	1: 512	1: 512	1: 64	1:1024
II	1:2048	1:2048	1:2048	1:1024	1:4096	1: 256	1:4096

	ST 15	ST 16	ST 17	ST 18	ST 19	Clin. isol. M. (ST 12)
I	1: 256	1:1024	1:1024	1: 512	1:2048	1:1024
II	1: 512	1:4096	1:4096	1:1024	1:8192	1:2048

Die Mäuse wurden mit 'äusserer Membran Vaccine, gewonnen von Serotyp 12, immunisiert.

Die Antikörper Titer gegen alle 19 Serotypen wurden vor (I) und nach (II) experimenteller Infektion mit Serotyp 5 gemessen.

Tab. 2: Serum-Antikörpertiter gegen intakte Bakterien der Serotypen 1-19 von *Pseudomonas aeruginosa*, bestimmt durch Immunfluoreszenz. Die Antikörpertiter gegen alle 19 Serotypen wurden vor (I) und nach (II) experimenteller Infektion mit Serotyp 5 gemessen. Die Titer sind als Kehrwert der höchsten Serumverdünnung angegeben, bei der mindestens 50 % der Bakterien noch positive Fluoreszenz zeigten

Serotyp	LD ₅₀ Impfinge	LD ₅₀ Kontrollen	Δ LD ₅₀
01	2,16x10 ⁸	2,17x10 ⁷	10,00
02	3,24x10 ⁸	2,24x10 ⁷	14,46
03	3,81x10 ⁸	1,2 x10 ⁸	3,17
04	5,64x10 ⁸	2,15x10 ⁷	26,23
05	5,44x10 ⁷	6,62x10 ⁶	8,21
06	6,54x10 ⁸	2,6 x10 ⁷	25,15
07	1,04x10 ⁸	9,05x10 ⁶	11,49
08	7,58x10 ⁸	1,10x10 ⁸	6,89
09	1,87x10 ⁸	8,91x10 ⁷	2,1
10	5,33x10 ⁷	8,9 x10 ⁶	5,98
11	1,64x10 ⁸	3,16x10 ⁷	5,19
12	1,03x10 ⁹	1,7 x10 ⁸	6,05
13	2,07x10 ⁸	1,39x10 ⁷	14,89
14	8,5 x10 ⁹	2,7 x10 ⁹	3,15
15	2,63x10 ⁸	3,89x10 ⁷	6,76
16	6,18x10 ⁷	1,36x10 ⁷	2,71
17	2,28x10 ⁸	8,72x10 ⁷	2,61
18	3,42x10 ⁸	4,31x10 ⁷	7,94
19	1,64x10 ⁹	8,41x10 ⁷	19,50

Tab. 3: Verschiebung der LD₅₀ nach aktiver Immunisierung von Mäusen mit äußerer Membranprotein-Vaccine und darauffolgender Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* Serotyp 1-19. Mit F, H₂ und J vaccinierte Mäuse oder Kontrollen wurden in Gruppen von 6-8 Tieren mit Dosen zwischen 10⁶ und 10⁹ lebenden Organismen des entsprechenden Serotyps i.p. belastet und die Überlebenszahl aufgezeichnet. Die Berechnung der LD₅₀ erfolgte nach dem Verfahren von Spearman/Kärber.

Der Mittelwert des Verhältnisses der LD₅₀ der Impfgruppen und Kontrollen zueinander beträgt 13.29, bei einer Standardabweichung von ± 7.4 . Die statistische Auswertung ergab für jeden der getesteten Serotypen einen signifikanten Unterschied zwischen Impfingen und Kontrollen ($p < 0,005$).

D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Pseudomonas aeruginosa ist ein opportunistischer, gramnegativer Problemkeim, der eine Hauptursache für nosokomiale Infektionen darstellt.

Es finden sich dabei selten *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen bei Patienten mit ungestörter körpereigener Abwehr (39), dagegen führt der Erreger beim immunsupprimierten Patienten zu schwerwiegenden Erkrankungen mit hoher Mortalität, trotz der adäquaten Therapie mit Antibiotika und der in den letzten Jahren insbesondere auf den Intensivstationen getätigten Fortschritte (116). Diese Beobachtungen führten zur Intensivierung der Forschung auf dem Gebiete der Immuntherapie von *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen und unterstrichen insbesondere die große klinische Bedeutung einer aktiven Immunisierung gegen den Erreger.

Bis dato wurden mehrere Oberflächenantigene von *Pseudomonas aeruginosa* für eine aktive Immunisierung verwendet.

Insbesondere Lipopolysaccharide und äußere Membranproteine stellen Makromoleküle auf der Oberfläche dieses Organismus dar und erscheinen deshalb als potentielle Vaccine-Kandidaten geeignet.

Bei Impfstoffen auf der Basis von LPS wurden hohe schützende Antikörpertiter gemessen, als nachteilig erwies sich jedoch das Fehlen eines serotypübergreifenden Schutzeffektes, wodurch eine Mischung von unterschiedlichen LPS-Serotypen erforderlich war, sowie die toxischen Nebenwirkungen wie Fieber und lokaler Schmerz (85, 58).

Das Interesse an der Entwicklung einer Vaccine gegen *Pseudomonas aeruginosa* gab wiederholt Anlaß, die äußeren Membranproteine des Erregers als potentielle Komponenten einer Vaccine in Betracht zu ziehen (32, 44, 90).

Die Ergebnisse von Mutharia & Hancock (90) unterstrichen die Gemeinsamkeit dieser Proteine als antigene Determinanten ("common antigens") für alle Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa*. Zu dieser Aussage gelangten die Autoren durch den Nachweis einer Reaktion von radioaktiv markierten polyklonalen Antikörpern mit auf Nitrozellulose transferierten Membranproteinen.

Um festzustellen, ob die äußeren Membranproteine zur Beeinflussung von *Pseudomonas aeruginosa* herangezogen werden könnten, erschien es notwendig, ihre Rolle als Immunogene zu klären.

Fernandes et al. (32) machten darauf aufmerksam, daß Patienten in der Lage sind, im Laufe einer Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* Antikörper gegen äußere Membranproteine zu bilden. Den Autoren gelang es mittels Immunopräzipitation, Antikörper gegen zwei Zellmembranproteine aus den Seren von Patienten, die an Mukoviscidose erkrankt waren, nachzuweisen. Eines der isolierten Proteine wies ein Molekulargewicht von 37 500 Daltons auf, entsprechend dem Membranprotein F von *Pseudomonas aeruginosa*.

Dementsprechend konnten Lam et al. (67) zeigen, daß die drei Membranproteine F, H₂ und J bei Individuen, die akut oder chronisch mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert waren, immunogen wirkten. Durch zweidimensionale Immunelektrophorese wiesen Lam et al. Antikörper gegen alle drei Membranproteine in 220 Seren von Mukoviscidose-Patienten nach, die chronisch mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert waren. In Übereinstimmung mit den Daten von akut und chronisch erkrankten Patienten wurde im chronischen Ratten-Lungen-Modell, sieben Tage post infectionem, eine Antikörper-Antwort auf die drei untersuchten Membranproteine gefunden.

Seitdem bekannt ist, daß Protein F an der Zelloberfläche exponiert ist (68), erschien es denkbar, daß Protein F

mit dem körpereigenen Abwehrsystem reagieren und eine immunologische Antwort hervorrufen könnte.

Wie aber die Arbeit von Mutharia & Hancock (90) sowie eigene Ergebnisse zeigen, stellen auch die äußeren Membranproteine H₂ und J gemeinsame antigene Determinanten bei allen *Pseudomonas aeruginosa*-Serotypen dar.

H.E. Gilleland (38) benutzte gereinigtes Protein F, isoliert von Serotyp 01, als antigenen Bestandteil einer monovalenten *Pseudomonas*-Vaccine. Um festzustellen, ob durch seinen Impfstoff eine Kreuzimmunität gegen die experimentelle Infektion mit heterologen Serotypen aufgebaut worden sei, verwendete er hierzu allerdings nur zwei der insgesamt 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa*. Die von ihm als Versuchstiere verwendeten Mäuse erwiesen sich dabei als zu 90 % vor einer Infektion mit dreimal der LD₅₀ der heterologen Serotypen 08 und 09 geschützt.

Trotz dieser überzeugenden Ergebnisse ist zu bedenken, daß die Isolierung von reinem Protein F aufwendig ist. Durch Säulenchromatographie und SDS-Gelelektrophorese trennte Gilleland die Membranproteine auf und isolierte anschließend reines Protein F aus den Elektrophoresegelelen. Mit dieser Methode konnte Gilleland nur geringe Mengen an isoliertem Protein F gewinnen.

Da durch die zusätzliche Verwendung der gleichfalls bei allen Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* vorhandenen Proteine F, H₂ und J eine Erhöhung der Epitopdichte, welche bei der Komplementaktivierung von großer Bedeutung ist, erreicht wird, schien von Beginn an, als Grundgedanke der vorliegenden Arbeit, eine polyvalente Vaccine aus den drei Membranproteinen von größerem Wert zu sein.

Daneben erwies sich bei der Herstellung der polyvalenten Protein-Vaccine, daß sie einen geringeren Reinigungsaufwand erforderte und eine höhere Proteinausbeute erbrachte.

In dem hier zur Verwendung gelangten Infektionsmodell ließ sich nachweisen, daß durch die Immunisierung mit jeweils 50 µg Membranprotein vaccine (an Tag 1 und 14) unter Zusatz von 3 % Aluminiumhydroxid als Adjuvans, in 100 µl physiologischer NaCl-Lösung intraperitoneal verabreicht, Balb/c-Mäuse gegen einen Challenge (am Tag 21) mit heterologen Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* geschützt waren.

Besonders hervorzuheben ist, daß durch den Einsatz der polyvalenten Membranprotein vaccine nicht nur gegen einzelne, sondern gegen alle 19 bislang charakterisierten Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* eine signifikante Schutzwirkung erzielt werden konnte.

Beim Entwurf des Infektionsmodelles wurde neben der möglichst unbehinderten und reibungslosen Durchführung (in Anbetracht der aufgrund der Serotypenvielfalt erforderlichen großen Anzahl an Versuchstieren) auf eine weitestgehend praxisnahe, den üblichen Impfschemata entsprechende Realisation Wert gelegt. Dementsprechend wurde zwischen Erstimpfung und Revaccination eine verhältnismäßig lange Zeitspanne von 14 Tagen und daraufhin ein zusätzlicher zeitlicher Abstand von sieben Tagen bis zur Durchführung der experimentellen Infektion eingeräumt, um der körpereigenen Abwehr genügend Zeit zur Ausbildung einer belastbaren Immunität zu gewähren.

Nach Gabe verschieden hoher Dosen des Proteingemisches traten keinerlei lokale oder systemische Reaktionen an den Versuchstieren auf, was auf eine gute Verträglichkeit des Impfstoffes schließen läßt. Auch die wiederholte Gabe der Vaccine im Rahmen der Booster-Impfungen führte zu keinen erkennbaren Nebenwirkungen (z.B. im Sinne einer allergischen Reaktion). An dieser Stelle muß eingefügt werden, daß die Maus nicht das geeignete Versuchstier darstellt hinsichtlich eines Vergleiches der Verträglichkeit

der Protein-Vaccine durch Patienten.

Eine Anschlußarbeit hat die Erprobung von Schutzwirkung und Verträglichkeit der Vaccine zum Thema.

Von besonderer Tragweite ist die anlässlich der ELISA- bzw. Immunfluoreszenzmessungen gemachte Beobachtung, daß nach durchlaufener Infektion die Antikörpertiter gegen *Pseudomonas aeruginosa* nicht nur gegen denjenigen Serotyp ansteigen, mit welchem infiziert wurde, sondern gegen alle 19 Serotypen des Erregers.

Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß nicht die serotyp-spezifischen LPS-Antigene für die Schutzwirkung verantwortlich sind.

Gleichwohl erscheint es nicht ausgeschlossen, daß die Membranprotein-Vaccine mit Spuren von LPS kontaminiert ist, und der Immunisierungserfolg zumindest teilweise auf das LPS zurückgeführt werden könnte.

Bereits Gilleland et al. hegten diese Vermutung (38). Ihnen gelang es aber, den Verdacht durch zwei Beobachtungen zu entkräften und sicherzustellen, daß das in ihrer Vaccine enthaltene Membranprotein über eine immunisierende Wirkung verfügt und einen Schutzeffekt gewährleistet.

Zum einen waren mit isoliertem Protein F (LPS-frei) immunisierte Mäuse gegen einen Challenge mit heterologen Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* geschützt, wohingegen mit LPS vaccinierte Mäuse nur gegen die Belastung mit dem homologen Serotyp eine Schutzwirkung aufwiesen.

Ferner zeigten sie, daß eine Behandlung der Protein F-Vaccine mit Papain (ein proteolytisches Ferment) einen Verlust der Schutzwirkung gegen eine heterospezifische Belastung verursachte.

Bezugnehmend auf diese Ergebnisse folgerte Gilleland, daß die Schutzwirkung seiner Protein F-Vaccine vom darin enthaltenen Protein herrührt. Dieser Schutz ist getrennt von

jeglicher Schutzwirkung, die von dem in der Vaccine vorhandenen LPS stammen könnte.

Die beobachteten Differenzen anlässlich der Bestimmung der Antikörper-Titer bei Mäusen aus Gruppen mit gleicher Vaccinedosis durch ELISA bzw. Immunfluoreszenz können auf Abweichungen im Immunisierungserfolg zurückgeführt werden. Dies wurde bereits anlässlich eines Vorversuches sichtbar, wobei zwar gruppenweise unterschiedlich hohe Dosen an Protein-Vaccine gegeben wurden, gruppenintern dagegen jedes Einzeltier die gleiche Dosis erhielt. Trotzdem wurden innerhalb jeder Gruppe erhebliche Schwankungen der Antikörper-Titer unter den einzelnen Tieren registriert. Allem Anschein nach antworten individuelle Mäuse in unterschiedlichem Maße auf die Membranproteine.

Die gleiche Ursache dürfte sich auch auf die verzeichneten Differenzen bei der gemessenen LD₅₀, also dem Verhältnis der mittleren letalen Dosis von Impfgruppen und Kontrollgruppen, ausgewirkt haben.

Es ist zu erwarten, daß diesbezüglich durch wiederholte Revaccinierung eine Angleichung im Immunisierungserfolg erreicht werden könnte.

Trotz der von Mutharia und Hancock (90) berichteten Übereinstimmung im Membranproteinmuster, gezeigt durch Immunoblots mit radioaktiv markiertem polyvalenten Serum, wiesen nicht alle Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* eine gleichstarke Bindung von spezifischen Antikörpern an ihre Membranproteine auf.

In diesem Sinne registrierten dieselben Autoren einen Unterschied in der Intensität der Wechselwirkung zwischen spezifisch gegen die Proteine F und H₂ gerichteten monoklonalen Antikörpern und ihren entsprechenden Membranproteinen von verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa* Serotypen, als sie anlässlich der Ermittlung der Zelloberflächen-Lokalisierung der Membranproteine monoklonale Antikörper

gegen die Proteine F und H₂ einsetzten.

Mutharia & Hancock (91) schlugen daraufhin zwei mögliche Erklärungen für die verschieden starke Interaktion der spezifischen Antikörper mit ihren korrespondierenden Proteinen vor:

- 1) Der Gehalt an Protein in den jeweiligen Zellmembranen der unterschiedlichen Serotypen könnte unterschiedlich sein;
- 2) oder, es existieren individuelle antigenetische Determinanten auf den gegebenen Membranproteinen, die unterschiedliche Affinitäten für die Testantikörper aufweisen.

Hauptbeobachtung dieser Studie (91) war, daß Protein F an der Oberfläche der Bakterienzelle exponiert und zugänglich für Antikörper ist; eine Entdeckung, die durch indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern, spezifisch für antigene Determinanten auf dem Protein, unterstrichen wurde.

Erhärtet wurde diese Erkenntnis noch dadurch, daß die monoklonalen Antikörper gegen Protein F nicht an eine Protein F-defiziente Mutante von *Pseudomonas aeruginosa* banden.

Mutharia und Hancock (90) äußerten die Vermutung, daß andere *Pseudomonas*-Vaccinen, die eine Kreuzimmunität hervorrufen, wie Ribosomen- (71), Schleim-Glykolipoprotein- (9) und OEP-Vaccine (1), mit Membranproteinen kontaminiert sein könnten, und somit ein Teil der Schutzwirkung dieser Impfstoffe auf das Vorhandensein der Membranproteine zurückzuführen sei. Dazu wurden die Autoren durch die Beobachtung veranlaßt, daß einige der über 50 Polypeptide, die sich in der "Original Endotoxic Protein-Vaccine" (OEP) vorfinden, eine den Membranproteinen entsprechende Migration in der Elektrophorese zeigten, und

daß Antiseren gegen gereinigte Membranproteine stark an die Bestandteile der OEP-Vaccine banden.

Durch die Immunisierung mit der Membranprotein-Vaccine konnte eine signifikante Schutzwirkung gegen eine experimentelle *Pseudomonas*-Infektion erzielt werden. Die aktive Schutzimpfung löste Abwehrmechanismen aus, die allem Anschein nach vor allem auf einer Stimulierung der humoralen Immunitätsbildung beruhen.

Wenn auch einzelne Befunde für die Existenz einer zellulären Immunität gegen *Pseudomonas aeruginosa* sprechen (47, 101), so besteht doch kein Zweifel daran, daß die ausschlaggebende Schutzwirkung von humoralen Immunitätsmechanismen ausgeht (63, 12).

In die humorale Abwehr von *Pseudomonas*-Infektionen sind sowohl antitoxische als auch antibakterielle Antikörper eingeschaltet.

Pollack et al. (111) haben hohe Spiegel von neutralisierenden, antitoxisch wirkenden Antikörpern gegen die Exotoxine Elastase und Protease im Serum von Rekonvaleszenten nach durchlaufener *Pseudomonas*-Infektion nachgewiesen.

Die antibakteriellen Antikörper sind gegen Bestandteile der Zellwand von *Pseudomonas aeruginosa* gerichtet (101).

Sie sind essentiell für die Opsonierung der Erreger, um dadurch den Phagozyten, in erster Linie neutrophilen Granulozyten, zu ermöglichen, ihre Funktion auszuüben.

Browstein (17) sprach den Neutrophilen eine wichtige Rolle bezüglich der Begrenzung der Invasion gewisser Gewebe durch *Pseudomonas aeruginosa* zu, daneben verhindern diese Zellen das Entstehen einer Bakteriämie.

Normales Humanserum enthält Antikörper, welche die Opsonierung über das hitzelabile Serumkomplementsystem initiieren. Für sich allein sind diese sog. "natürlichen"

Antikörper unzureichende Opsonine (101), das heißt, sie bereiten die Bakterien nicht optimal für die Phagozytose durch Neutrophile vor.

Peterson (100) resümierte, daß die "natürlichen" Antikörper nicht per se opsonierend wirken, sondern ihre Funktion in der Aktivierung des Komplementsystems besteht. Bei mehreren Patienten mit einem Mangel an Immunglobulin IgG wurde das Auftreten von schwerwiegenden Infektionen, verursacht durch *Pseudomonas aeruginosa*, beschrieben (29). Young (132) erwähnte, daß die "natürlichen", opsonierenden Antikörper im normalen Serum hauptsächlich der IgM-Klasse angehören.

Im Gegensatz zu den "natürlichen" Antikörpern verfügen immunisierte Tiere und Patienten, die sich von einer *Pseudomonas*-Infektion erholten, über spezifische "immune" Antikörper, welche per se opsonierend wirken und überdies die Opsonierung durch Serumkomplement steigern.

Am Beispiel der Erregerabwehr in der Lunge legten Reynolds et al. (117) dar, daß "immune" IgG und S-IgA gleichermaßen die Phagozytose von *Pseudomonas aeruginosa* durch Alveolarmakrophagen vorantreiben. Daneben wiesen die Autoren darauf hin, daß IgG ein potenteres Opsonin als S-IgA darstellt.

Um durch die Erhöhung des Gehaltes an antibakteriellen Antikörpern eine Verbesserung der Abwehr gegen *Pseudomonas aeruginosa* zu erreichen, wurden Vaccinen entwickelt.

Die Steigerung der Überlebensrate durch aktive Immunisierung mit Membranproteinen ist offenbar durch einen Anstieg des Spiegels der opsonierenden Antikörper bewerkstelligt worden.

Als Reaktion auf die aktive Immunisierung mit Bestandteilen der Zellwand von *Pseudomonas aeruginosa* werden Anti-

körper der verschiedenen Immunglobulinklassen bzw. -subklassen gebildet. Eine auffallend hohe Serokonversion in der IgG-Fraktion nach Vaccinierung von Mäusen mit einer polyvalenten LPS-Vaccine erwähnten Merle et al. (85).

Im Gegensatz dazu beobachteten Miler et al. (87) die überwiegende Bildung von protektiven Antikörpern der IgM-Fraktion nach Immunisierung mit der polyvalenten Vaccine PEV-01.

Eigene Untersuchungen zeigten, daß durch die Membranprotein-Vaccine überwiegend die Bildung von IgG-Immunglobulinen stimuliert wurde. Die Fraktion der IgM-Antikörper erreichte nur knapp ein Viertel des von IgG erreichten Anteils. Die Schutzwirkung der Vaccine ist demnach hauptsächlich auf opsonierende Antikörper der IgG-Klasse zurückzuführen.

Die Immunantwort von Patienten auf die Vaccinierung mit einer Polysaccharid-Vaccine wurde in einer Studie von Pier (105) charakterisiert. Seine Ergebnisse lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß alle drei der Serum-Immunglobulin-Isotypen, IgG, IgM und IgA, mit Phagozyten des peripheren Blutes in Wechselwirkung traten, wodurch diese das Abtöten von *Pseudomonas aeruginosa* bewerkstelligen konnten.

Die meisten der Imflinge wiesen IgG als dominierenden Serum-Antikörper auf, während eine Minderheit hohe Spiegel an IgM-Antikörpern besaß.

Komplement wurde für die IgM-bewirkte Phagozytose benötigt, es steigerte zudem das durch IgG verursachte Abtöten der Erreger, war aber nicht erforderlich für die durch IgA herbeigeführte Eliminierung der Keime.

Des weiteren erwiesen sich Serum-IgA und periphere Blutleukozyten in der Lage, einen hohen Anteil des initialen Inokulums von *Pseudomonas aeruginosa* zu beseitigen. Dieser

Vorgang schien Komplement-unabhängig zu sein.

Dagegen zeigte IgM offensichtlich ein absolutes Erfordernis an Komplement, um eine Opsonophagozytose des Erregers bewirken zu können.

IgG-Opsonine, die sich erneut als am effektivsten erwiesen, waren zwar in der Lage, Phagozytose bei Abwesenheit von Komplement zu bewirken, jedoch wiesen sie in Gegenwart von Komplement höhere Abtötungsraten auf.

Das Erfordernis nach Komplement für die IgM-verursachte Beseitigung der Erreger weist auf das Fehlen von Rezeptoren für IgM bei den phagozytierenden Zellen hin (70).

Im Zusammenwirken mit polymorphnukleären Leukozyten bewirkte IgG stärkste Phagozytose, hingegen erwies sich IgA im Zusammenhang mit mononukleären Zellen als bester Mediator.

Das Vermögen von sowohl polymorphnukleären Leukozyten als auch von Monozyten, den mit IgG bzw. IgA opsonierten Erreger zu beseitigen, kann auf Rezeptoren für die Fc-Portion dieser Immunglobuline an den peripheren Blutzellen zurückgeführt werden.

Die Tatsache, daß es sich bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* um einen therapieresistenten Erreger handelt, der vorzugsweise in ihrer Abwehr geschwächte Patienten befällt, oft zu chronischem Krankheitsverlauf Anlaß gibt und nicht isoliert, sondern im Zusammenhang mit einer Vielzahl von sich opportunistisch gebenden Hospitalismuskkeimen betrachtet werden muß, gibt Anlaß dazu, die paraspezifischen Wirkungen von Schutzimpfungen zu unterstreichen.

Parallel zu den beabsichtigten Immunisierungsvorgängen löst jede Schutzimpfung auch Reaktionen im Organismus aus, die weder erregerspezifisch noch antigen- bzw. immuno-spezifisch sind und so stark sein können, daß sie

einen vorübergehenden Schutz auch gegen Infektionserreger vermitteln, die mit den im Impfstoff enthaltenen immunisierenden Antigenen weder identisch noch immunologisch verwandt sind (84).

Besonders auffällig ist die paraspezifische Wirkung nach einer aktiven Immunisierung.

Da neben *Pseudomonas aeruginosa* eine Anzahl weiterer, für das Auftreten von nosokomialen Infektionen ursächlicher Hospitalismuskeime bekannt ist, und diese häufig erst durch ihr synergistisches Zusammenwirken von einer Infektion zur Krankheit führen, erscheint es denkbar, daß die aktive Immunisierung mit der Membranprotein-Vaccine durch die von ihr ausgelösten paraspezifischen Wirkungen einen kurzfristig erhöhten Schutz gegen diese Begleitkeime gewährleistet.

Wie Mayr (84) ausführt, aktiviert bei Antigenimpfstoffen insbesondere das immunisierende Antigen die Mikro- und Makrophagentätigkeit und stimuliert zudem das lymphoretikuläre Zellsystem und bestimmte humorale Faktoren. Zusätzlich bewirken die Begleitstoffe der Vaccine eine Steigerung der humoralen Abwehrmechanismen.

Letztendlich vermag die durch die aktive Immunisierung hervorgerufene Paramunität die Konversion einer Infektion in eine Krankheit zu vereiteln sowie das Angehen neuer Infektionen zu verhindern.

Pseudomonas aeruginosa kann in die wachsende Liste derjenigen Organismen eingereiht werden, bei denen der nutzbringende Gebrauch der Zellmembran-Proteine als Komponenten einer Vaccine untersucht und bestätigt worden ist. Darunter finden sich *Neisseria meningitidis* (34), *Neisseria gonorrhoeae* (19), *Salmonella typhimurium* (66), *Shigella species* (3), *Hämophilus influenzae* Typ B (74), *Escherichia coli* (51), *Vibrio cholerae* (60) und *Proteus mirabilis* (61). Bei allen, der immunologischen Beeinflus-

sung dieser Erreger dienenden Untersuchungen konnte eine Immunantwort auf die applizierten Membranprotein-Vaccinen verzeichnet werden.

Die äußeren Zellmembran-Proteine versprechen ein wirksames Impfstoffantigen gegen eine Anzahl gramnegativer Bakterien zu sein. Diese gemeinsame Eigenschaft spricht für einen identischen Aufbau der Zellmembran dieser Bakteriengruppe.

Eine denkbare klinische Anwendung der Membranprotein-Vaccine würde die aktive Immunisierung von Patienten, die an Mukoviscidose erkrankt sind, bedeuten.

Dafür spricht vornehmlich die hohe Anfälligkeit von bis zu 72 % dieser Patientengruppe gegenüber einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. Nachdem es zu einer Besiedelung der Patienten, insbesondere der Lunge, mit dem Erreger gekommen ist, erfolgt nur noch eine sehr geringgradige Eliminierung von *Pseudomonas aeruginosa*.

Es erscheint deshalb angebracht, die betroffenen Patienten präventiv, unmittelbar nach Diagnostizierung der Erkrankung, anhand eines geeigneten Impfregimes mit der Membranprotein-Vaccine dauerhaft zu immunisieren.

Neben dem Einsatz von aktiven Impfstoffen schlug Geddes (35) den Gebrauch effektiver Antibiotika und besonderer Maßnahmen vor, wie Bronchiallavage, um eine Besiedelung der Lungen mit dem Erreger zu verhindern.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß die aktive Immunisierung mit der Membranprotein-Vaccine einen konkreten Schutz gegen hochvirulente *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme zu gewährleisten vermag.

In dem zur Verwendung gekommenen Mäusemodell scheinen opsonierende Antikörper der IgG-Fraktion die Entwicklung einer Bakteriämie vereitelt bzw. in Grenzen gehalten zu haben, wodurch eine letale Sepsis verhindert werden konnte.

E ZUSAMMENFASSUNG

Eine Zellmembranprotein-Vaccine, bestehend aus den äußeren Membranproteinen F, H₂ und J, wurde aus *Pseudomonas aeruginosa* Serotyp 12 hergestellt. 50 µg der Vaccine induzierten in Balb/c-Mäusen hohe Serumantikörpertiter gegen alle bekannten 19 Serotypen. Im Schutzversuch gegen die intraperitoneale Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* zeigten die vaccinierten Mäuse mit allen 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* eine signifikant höhere Keimbelastbarkeit, im Vergleich zu Kontrolltieren.

SUMMARY

Active Immunization against *Pseudomonas aeruginosa* with an Outer Membrane Vaccine in Mice

An outer membrane vaccine containing the outer membrane proteins F, H₂ and J was purified from serotype 12 of *Pseudomonas aeruginosa*. After immunization with 50 µg of the vaccine Balb/c-mice showed an increase in antibody titer to all 19 serotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. Immunized mice showed significant higher protection against an intraperitoneal challenge with all known 19 serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* compared with an untreated control group.

F ANHANG

Verwendete Abkürzungen:

Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CFA	Freund's komplettes Adjuvans
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assays
g	9,81 m/sec ² (Erdbeschleunigung)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IATS	International Antigenic Typing Scheme
Ig	Immunglobulin
LD ₅₀	Dosis letalis ₅₀
LPS	Lipopolysaccharid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
OPD	O-Phenylendiamin
PBS	Phosphat buffered saline
SDS	Natrium Dodecyl-sulfat
SDS-PAGE	Natrium Dodecyl-sulfat-Polyacrylamid-Gel- elektrophorese
TS	Trypticase-Soy

G LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Abe, C.; Shionoya, H.; Hirao, Y.; Okada, K.; Homma, J.Y. (1975): Common protective antigen (OEP) of *Pseudomonas aeruginosa*. Jpn.J.Exp.Med. 45, 355
- (2) Abe, C.; Tanamoto, K. and Homma, J.Y. (1977): Infection protective property of the common antigen (OEP) of *Pseudomonas aeruginosa* and its chemical composition. Jpn.J.Exp.Med. 47, 393
- (3) Adamus, G.; Mulczyk, D.; Witkowska, D. and Romanowska, E. (1980): Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* spp. Infect. Immun., 30, 321
- (4) Alexander, J.W. and Fisher, M.W. (1974): Immunization against *Pseudomonas* infection after thermal injury. J.Infect.Dis. 130, 152
- (5) Ansorg, R.; Schmitt, W. und Schwerk, V. (1978): Antikörperbildung gegen somatische und flagellare Antigene von *Pseudomonas aeruginosa*. Med.Microbiol.Immun. 165, 181
- (6) Ansorg, R (1978): Flagellaspezifisches H-Antigenschema von *Pseudomonas aeruginosa*. Zbl.Bakt. I.Orig. 242, 228
- (7) Baltch, A.L.; Hammer, M.; Smith, R.P. and Sutphen, N. (1979): *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Susceptibility of 100 blood culture isolates to seven antimicrobial agents and its clinical significance. J.Lab.Clin.Med. 94, 201

- (8) Baltimore, R.S. (1974): Clinical and epidemiological correlates of *Pseudomonas* typing.
J.Infect.Dis 130 suppl., 53
- (9) Bartell, P.F.; Orr, T.E. and Chudio, B. (1970):
Purification and chemical composition of the protective slime antigen of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect.Immun. 2, 543
- (10) Bjornson, B.A. and Michael, J.B. (1971): Contribution of humoral and cellular factors to the resistance of experimental infection by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. I. Interactions between immunoglobulins, heat-labile serum factors, and phagocytic cells in the killing of bacteria.
Infect.Immun. 4, 462
- (11) Bjornson, A.B. and Alexander, J.W. (1973): Alterations of serum opsonins in patients with severe thermal injury. J.Lab.Clin.Med. 83, 372
- (12) Bocanegra, M. and Rosenthal, S.M. (1966): Convalescent burn plasma therapy for severely burned children. Control study of 81 cases and tests for *Pseudomonas* antibodies. Ann.Surg. 163, 461
- (13) Brandis, H. (1954): Über die Promunität (Depressionsimmunität). Erg.Hyg.Bakt. 28, 141
- (14) Braude, A.I.; Douglas, H. and David, C.E. (1973): Treatment and prevention of intravascular coagulation with antiserum to endotoxin.
J.Infect.Dis. 128, 5157
- (15) Brokopp, C.D. and Farmer J.J. (1979): Typing methods for *Pseudomonas aeruginosa*. In: Doggett, R.G.

- (ed.): *Pseudomonas aeruginosa* - Clinical manifestations of infection and current therapy. Academic Press, London
- (16) Brown, M.R.W. (1975): Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. John Wiley, London and New York
- (17) Browstein, D.G. (1978): Pathogenesis of bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* in cyclophosphamid-treated mice and potentiation of virulence of endogenous streptococci. *J.Infect.Dis.* 137, 795
- (18) Bryan, L.E. (1979): Resistance to antimicrobial agents. The general nature of the problem and the basis of resistance. In: Doggett, R.G. (ed.): *Pseudomonas aeruginosa* - Clinical manifestations of infection and current therapy. Academic Press, London
- (19) Buchanan, T.M.; Pearce, G.; Schoolnik, W. and Arko, R.J. (1977): Protection against infection with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pili. *J.Infect.Dis.* 136 suppl., 132
- (20) Charrin, A. and Roger, C.H. (1889): Action du serum des animaux malades ou vaccines sur les microbes pathogenes. *C.R.Acad.Sci.*, Paris, 109, 710
- (21) Costerton, J.W.; Brown, M.R.W. and Sturgess, J.M. (1979): The cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa*. Its role in infection. In: Doggett, R.G. (ed.): *Pseudomonas aeruginosa* - Clinical manifestations of infection and current therapy. Academic Press, London

- (22) Cryz, S.J.; Fürer, E. and Germanier, R. (1983):
Passive protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in an experimental leukopenic mouse model. *Infect.Immun.* 40, 659
- (23) Cryz, S.J.; Fürer, E. and Germanier, R. (1984):
Protection against fatal *Pseudomonas aeruginosa* burn wound sepsis by immunization with lipopolysaccharide and high-molecular-weight polysaccharide. *Infect.Immun.* 43, 795
- (24) Dirienzo, J.M.; Nakamura, K. and Inouye, M. (1978):
The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: Biosynthesis, assembly, and functions. *Ann.Review Biochem.* 47, 481
- (25) Doggett, R.G. (1979): Microbiology of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Doggett, R.G. (ed.): *Pseudomonas aeruginosa - Clinical manifestations of infection and current therapy*. Academic Press, London
- (26) Eagon, R.G. (1974): Ultrastructure of the cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa*; electron-microscopic and chemical observations. *J.Infect.Dis.* 130 suppl., 65
- (27) Evans, L.R. and Linker, A. (1973): Production and characterization of slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* 116, 915
- (28) Farmer, J.J. (1976): *Pseudomonas* in the hospital. *Hospital Practice* 11, 63
- (29) Faulk, W.P. and Ludenberg, H.H. (1971): Deficiency of IgM. *Pediatrics* 47, 399

- (30) Feingold, D.S. and Oski, F. (1965): Pseudomonas infection. Treatment with immune human plasma. Arch.Intern.Med. 116, 326
- (31) Feller, I. and Pierson, C. (1968): Pseudomonas vaccine and hyperimmunoplasma for burned patients. Arch.Surg. 97, 225
- (32) Fernandes, P.B.; Kim, C.; Cundy, K.R. and Huang, N.N. (1981): Antibodies to cell envelope proteins of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. Infect.Immun. 33, 527
- (33) Fisher, M.W.; Devlin, H.B. and Gnabasik, F.J. (1969): New immunotype schema for Pseudomonas aeruginosa based on protective antigens. J.Bacteriolog. 98, 835
- (34) Frasch, C.E.; Peppler, M.S.; Cate, T.C. and Zahradnik, J.M. (1982): Immunogenicity and clinical evaluation of group B Neisseria meningitidis outer membrane protein vaccines. In: Robbins, J.B. (ed.): Seminars in infectious disease, vol. IV: bacterial vaccines. Thieme-Stratton, Inc., New York
- (35) Geddes, A.M. (1980): Diseases caused by Pseudomonas aeruginosa: Other infections. In: Sabath, L.D. (ed.): Pseudomonas aeruginosa. Verlag Hans Huber, Bern-Stuttgart-Wien
- (36) Gilardi, G.L. (1979): Identification of glucose-nonfermenting gram-negative bacteria. Hospital for Joint Diseases, New York

- (37) Gilbert, D.N. (1985): An evaluation of antipseudomonal antimicrobial agents. In: Speert, D.P.; Hancock, R.E.W. (eds.): *Pseudomonas aeruginosa*. New therapeutic approaches from basic research. Karger, Basel-New York
- (38) Gilleland, H.E.; Parker, M.G.; Matthews, J.M. and Berg, R.D. (1984): Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. *Infect.Immun.* 44, 49
- (39) Govan, J.; Reiss-Levy, E.; Bader, L. and Schoenell, M. (1977): *Pseudomonas pneumonia* with bacteremia. *Med.J.Aust.* 1, 627
- (40) Govan, J.R.W. (1978): Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Methods of Microbiology*, Vol. 10. Academic Press, London
- (41) Habs, J. (1957): Untersuchungen über die O-Antigene von *Pseudomonas aeruginosa*. *Z.Hyg.Infektionskr.* 144, 218
- (42) Haghbin, M.; Armstrong, D. and Murphy, M.L. (1973): Controlled prospective trial of *Pseudomonas aeruginosa* in children with acute leukaemia. *Cancer (Philadelphia)* 32, 761
- (43) Hancock, R.E.W. and Carey, A.M. (1979): Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: Heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J.Bacteriol.* 140, 902
- (44) Hancock, R.E.W.; Decad, G.M. and Nikaido, H. (1979): Identification of the protein producing trans-

membrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

Biochim.Biophys.Acta 554, 323

- (45) Hancock, R.E.W.; Mouat, E.L.A. and Speert, D.P. (1984): Quantitation and identification of antibodies to outer-membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* in sera of patients with cystic fibrosis. J.Infect.Dis. 149, 220
- (46) Hanessian, S.; Regan, W.; Watson, D. and Haskell, T.H. (1971): Isolation and characterization of antigenic components of a new heptavalent *Pseudomonas* vaccine. Nature (New Biol.) 229, 7:209
- (47) Harvath, L.; Anderson, B.R. and Amirault, H.J. (1976): Passive immunity against *Pseudomonas* sepsis during granulocytopenia. Infect.Immun. 14, 1151
- (48) Harvath, L.; Anderson, B.R.; Zander, A.R. and Epstein, R.B. (1976): Combined pre-immunization and granulocyte transfusion therapy for treatment of *Pseudomonas* septicemia in neutropenic dogs. J.Lab.Clin.Med. 87, 840
- (49) Hasegawa, Y.; Yamada, H. and Mizushima, S. (1976): *Pseudomonas aeruginosa*. J.Biochem. 80, 1401
- (50) Himmer, G. (1978): Prophylaxe bzw. Therapie bei *Pseudomonas aeruginosa*-Wundinfektionen durch Steigerung der nichterreger-spezifischen Abwehr. Vet.Diss., München
- (51) Hofstra, H. and Dankert, J. (1980): Preparation and quantitative determination of antibodies against

major outer membrane proteins of *Escherichia coli* 026 K60. *J.Gen.Microbiol.* 117, 437

- (52) Hoiby, N. (1977): *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 262, 1
- (53) Holder, I.A. and Haidaris, C.G. (1979): Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: extracellular protease and elastase as in vivo virulence factors. *Can.J.Microbiol.* 25, 593
- (54) Homma, J.Y. (1982): Perspectives on the development of a new vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection. In: Easman, C.S.F. and Jeljaszewicz (eds.): *Medical microbiology*, Vol. 1. Academic Press Inc., New York
- (55) Homma, J.Y.; Abe, C.; Yanagawa, R. and Noda, H. (1983): Effectiveness of immunization with multi-component vaccines in protection against hemorrhagic pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* infection in mink. *Rev.Inf.Dis.* 5 suppl., 858
- (56) Jones, E.C.; Alexander, J.W. and Fisher, M.W. (1973): Clinical evaluation of *Pseudomonas* hyperimmune globulin. *J.Surg.Res.* 14, 87
- (57) Jones, R.J.; Roe, E.A. and Gupta, J.L. (1978): Low mortality in burned patients in a *Pseudomonas* vaccine trial. *Lancet* 11, 401
- (58) Jones, R.J.; Roe, E.A. and Gupta, J.L. (1979): Controlled trials of a polyvalent *Pseudomonas* vaccine in burns. *Lancet*, 1979, Nov. 10, 977

- (59) Kabat, E.A. (1971): Einführung in die Immunchemie und Immunologie. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- (60) Kabir, S. (1980): Composition and immunochemical properties of outer membrane proteins of *Vibrio cholerae*. J.Bacteriol. 144, 382
- (61) Karch, H. and Nixdorff, K. (1981): Antibody-producing cell responses to an isolated outer membrane protein and to complexes of this antigen with lipopolysaccharide or with vesicles of phospholipids from *Proteus mirabilis*. Infect.Immun. 31, 862
- (62) Kazmierowski, J.A.; Reynolds, H.Y.; Kauffman, J.C. and Devlin, H.B. (1977): Experimental pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* in leukopenic dogs: Prolongation of survival by combined treatment with passive antibody to *Pseudomonas* and granulocyte transfusions. J.Infect.Dis. 135, 438
- (63) Kostiala, A.A.I. (1980): *Pseudomonas aeruginosa* infection and vaccination in the rat. J.Med.Microbiol. 13, 201
- (64) Kühn, H.; Höpker, W.W. und Patzschke, U. (1977): Panorama- und Gestaltwandel der Infektionskrankheiten im Sektionsgut des Pathologischen Institutes der Universität Heidelberg während drei Dezennien Chemotherapie. Infection 5, 98
- (65) Kulczycki, L.L.; Murphy, T.M. and Bellanti, J.A. (1978): *Pseudomonas* colonization in cystic fibrosis: a study of 160 patients. JAMA 240, 30

- (66) Kuusi, N.; Nurminen, M.; Saxen, H.; Valtonen, M. and Makela, P.H. (1979): Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis in mice. *Infect.Immun.* 25, 857
- (67) Lam, J.S.; Mutharia, L.M.; Hancock, R.E.W.; Hoiby, N. and Costerton, J.W. (1983): Immunogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane antigens examined by crossed immunoelectrophoresis. *Infect.Immun.* 42, 88
- (68) Lambert, P.A. and Booth, B.R. (1982): Exposure of outer membrane proteins on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 revealed by labelling with ^{125}I -lactoperoxidase. *FEMS Microbiol.Lett.* 14, 43
- (69) Lanyi, B. and Bergan, T. (1978): Serological characterization of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Methods in Microbiology*, Vol. 10. Academic Press, London
- (70) Lawrence, D.A.; Weigle, W.O. and Spiegelberg, H.L. (1975): Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes and neutrophils. *J.Clin.Invest.* 55, 368
- (71) Lieberman, M.M. (1978): *Pseudomonas* ribosomal vaccines: Preparation, properties and immunogenicity. *Infect.Immun.* 21, 76
- (72) Lieberman, M.M. and Ayala, E. (1983): Active and passive immunity against *Pseudomonas aeruginosa* with a ribosomal vaccine and antiserum in C3H/HeJ Mice. *J. of Immunology* 131, No. 1

- (73) Liu, P.V. (1961): The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis. *J.Infect.Dis.* 108, 218
- (74) Loeb, M.R. and Smith, D.H. (1982): Human antibody response to individual outer membran proteins of *Haemophilus influenzae* type B. *Infect.Immun.*37, 1032
- (75) Long, G.G.; Gallina, A. and Gorham, J. (1980): *Pseudomonas pneumonia* of mink: Pathogenesis, vaccination and serologic studies. *Am.J.Vet.Res.* 41, No. 10, 1720
- (76) Lowbury, E.L. and Jones, R.J. (1975): Treatment and prophylaxis for *Pseudomonas* infections. In: Brown, M.R.W. (ed.): *Resistance of Pseudomonas aeruginosa*. John Wiley, London and New York
- (77) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurements with the Folin Phenol Reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265
- (78) Lugtenberg, B.; Meijers, J.; Peters, R.; van der Hoek, P. and van Alven, L. (1975): Electrophoretic resolution of the major outer membrane proteins of *E. coli* K12 into 4 bands. *FEBS Lett.* 58, 254
- (79) Markman, B.; Fall-Person, M. and Salenstedt, C.R. (1982): Immunization against *Pseudomonas aeruginosa*: The effects of serotype and virulence in mouse protection tests. *J.Biol.Stand.* 10, 319
- (80) Mayr, A. (1976): Neue Schwerpunkte in der Infektionsmedizin. *Zbl.Bakt.Hyg.,I.Abt.Orig.B* 163, 81

- (81) Mayr, A. (1977): Aktive Praemunisierung (I).
Kleintierparxis 22, 85
- (82) Mayr, A.; Stickl, H.; Westhues, M.; Gillesberger, W.; Schwarz, D. und Bibrack, B. (1977): Therapie von Herpes Zoster durch aktive Praemunisierung.
1. Therapiemöglichkeiten, Grundlagen und Prinzipien der Praemunität-Praemunisierung.
Fortschr.Med. 95, 87
- (83) Mayr, A.; Himmer, G.; Baljer, G. und Sailer, J. (1979): Erregerunspezifische Prophylaxe und Therapie von Pseudomonas aeruginosa-Wundinfektionen mittels Paramunisierung im Mäusemodell.
Zbl.Bakt.I.Orig.A 244, 506
- (84) Mayr, A. und Bibrack, B. (1984): Handbuch der Schutzimpfungen. Verlag Paul Parey
- (85) Merle, P.; Robbel, J. und Hungerer, K.D. (1984):
A new polyvalent Pseudomonas vaccine.
Behring Inst.Mitt. 76, 113
- (86) Meitert, T. und Meitert, E. (1966): Utilisation combinee du serotypage et de la lysotypie des souches de Pseudomonas aeruginosa.
Arch.Roum.Path.Exp.Microbiol. 25, 427
- (87) Miler, J.M.; Jones, R.J.; Spilsbury, J.F.; Roe, R.J. and Lowbury, E.J.L. (1977): A new polyvalent Pseudomonas vaccine. J.Med.Microbiol. 10, 19
- (88) Mizuno, T. and Kageyama, M. (1979): Isolation and characterization of major outer membrane proteins of Pseudomonas aeruginosa strain PA01 with spe-

cial reference to peptidoglycan-associated protein. J.Biochem. 86, 979

- (89) Munster, A.M.; Loadholdt, C.B.; Leary, A.G. and Barnes, M.A. (1977): The effect of antibiotics on cell-mediated immunity. Surgery 81, 692
- (90) Mutharia, L.M.; Nicas, T.I. and Hancock, R.E.W. (1982): Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. J.Infect.Dis. 146, 770
- (91) Mutharia, L.M. and Hancock, R.E.W. (1983): Surface localization of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F by using monoclonal antibodies. Infect.Immun. 42, 1027
- (92) Nakamura, K. and Mizushima, S. (1976): *Pseudomonas aeruginosa*. J.Biochem. 80, 1411
- (93) Neu, H.C. (1978): Clinical role of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Gilardi, G.L. (ed.): Glucose-nonfermenting gram-negative bacteria in clinical microbiology. CRC Press, West Palm Beach, Florida
- (94) Nicas, T.J. and Hancock, R.E.W. (1983): *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability: isolation of a porin protein F-deficient mutant. J.Bacteriol. 153, 281
- (95) Pavlovskis, O.R. and Wretling, B. (1979): Assessment of protease (elastase) as a *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor in experimental mouse burn infection. Infect.Immun. 24, 181

- (96) Pennington, J.E. (1974): Preliminary investigations of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine in patients with leukemia and cystic fibrosis. *J.Infect.Dis.* 130 suppl., 159
- (97) Pennington, J.E.; Reynolds, H.Y.; Wood, R.E.; Robinson, R.A. and Levin, A.S. (1975): Use of a *Pseudomonas aeruginosa* vaccine in patients with acute leukemia and cystic fibrosis. *Am.J.Med.* 58, 629
- (98) Pennington, J.E. (1979): Immunotherapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections. In: Doggett, G.E. (ed.): *Pseudomonas aeruginosa: Clinical manifestations of infection and current therapy.* Academic Press, New York
- (99) Pennington, J.E.; Hickey, W.F.; Blackwood, F. and Arnaut, M. (1981): Active immunization with lipopolysaccharide *Pseudomonas* antigen for chronic *Pseudomonas bronchopneumonia* in guinea pigs. *J.Clin.Invest.* 68, 1140
- (100) Peterson, P.K.; Kim, Y.; Schmeling, D.; Lindeman, M.; Verhoef, J. and Quie, P.G. (1978): Complement-mediated phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Lab.Clin.Med.* 92, 883
- (101) Peterson, P.K. (1980): Host defense against *Pseudomonas aeruginosa*. In: Sabath, L.D. (ed.): *Pseudomonas aeruginosa*. Hans Huber, Bern-Stuttgart-Wien
- (102) Pier, G.B.; Sidberry, H.F.; Zolyomi, S.F. and Sadoff, J.C. (1978): Isolation and characterization of

high molecular weight polysaccharide from the
slime of *Pseudomonas aeruginosa*.

Infect.Immun. 22, 908

- (103) Pier, G.B.; Sidberry, H.F. and Sadoff, J.C. (1981):
High molecular weight polysaccharide antigen
from immunotype 2 *Pseudomonas aeruginosa*.
Infect.Immun. 34, 461

- (104) Pier, G.B.; Cohen, M. and Jennings, H. (1983):
Further purification and characterization of
high-molecular-weight polysaccharide from *Pseu-*
domonas aeruginosa. Infect.Immun. 42, 936

- (105) Pier, G.B. and Thomas, D.M. (1983): Characterization
of human immune response to a polysaccharide
vaccine from *Pseudomonas aeruginosa*.
J.Infect.Dis. 148, 206

- (106) Pier, G.B.; Pollack, M. and Cohen, M. (1984): Immu-
nochemical characterization of high-molecular-
weight polysaccharide from Fisher immunotype 3
Pseudomonas aeruginosa. Infect.Immun. 45, 305

- (107) Pier, G.E. (1985): *Pseudomonas aeruginosa* surface
polysaccharide vaccines. In: Speert, D.P.; Han-
cock, R.E.W. (eds.): *Pseudomonas aeruginosa*, new
therapeutic approaches from basic research.
Karger Verlag, Basel-New York

- (108) Pitt, T.L. and Bradley, D.E. (1975): The antibody
response to the flagella of *Pseudomonas aeru-*
ginosa. J.Med.Microbiol. 8, 97

- (109) Pitt, T.L. (1979): A study of the heat-labile anti-
gens of *Pseudomonas aeruginosa*. PhD.Thesis, CNAA

- (110) Pitt, T.L. (1980): State of the art: Typing *Pseudomonas aeruginosa*. J.Hospital Infect. 1, 195
Academic Press, London
- (111) Pollack, M.L.; Callahan, L.T. and Taylor, N.S.
(1976): Neutralizing antibody to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin in human sera: Evidence for in vivo toxin production during infections.
Infect.Immun. 14, 942
- (112) Pruitt, B.A., Jr. (1974): Infections caused by *Pseudomonas* species in patients with burns and in other surgical patients.
J.Infect.Dis. 130 suppl., 8
- (113) Raeburn, J.A. (1972): Antibiotics and immunodeficiency. Lancet 4, 954
- (114) Rampling, A. (1975): Pyocin-sensitivity testing as a method of typing *Pseudomonas aeruginosa*. Use of a "phage-free" preparation of pyocin.
J.Med.Microbiol. 8, 531
- (115) Reeves, P. (1965): The bacteriocins.
Bacteriol.Rev. 29, 24
- (116) Reynolds, H.Y.; Levine, A.S.; Wood, R.E.; Zierdt, C.H.; Dale, D.C. and Pennington, J. (1975): *Pseudomonas aeruginosa* infections: Persisting problems and current research to find new therapies. Ann.Intern.Med. 82, 819
- (117) Reynolds, H.Y.; Kazmierowski, J.A. and Newball, H.H. (1975): Specificity of opsonic antibodies to enhance phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*.

nosa by human alveolar macrophages.

J.Clin.Invest. 56, 376

- (118) Reynolds, H.Y. and Fick, R.B. (1980): *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections (emphasizing nosocomial pneumonia in cystic fibrosis). In: Sabath, L.D. (ed.): *Pseudomonas aeruginosa*. Verlag Hans Huber, Bern-Stuttgart-Wien
- (119) Roe, E.A. and Jones, R.J. (1983): Immunization of burned patients against *Pseudomonas aeruginosa* infection at Safdarjang Hospital, New Delhi. Rev.Inf.Dis. 5 suppl., 922
- (120) Sachs, A. (1970): Active immunoprophylaxis in burns with a new multivalent vaccine. Lancet 11, 959
- (121) Sawada, S.; Suzuki, M.; Kawamura, T.; Masuho, Y. and Tonibe, K. (1984): Protection against infection with *Pseudomonas aeruginosa* by passive transfer of monoclonal antibodies to lipopolysaccharides and outer membrane proteins. J.Infect.Dis. 150, 570
- (122) Schebitz, H. und Brass, W. (1975): Allgemeine Chirurgie für Tierärzte. Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg
- (123) Schimpff, S.C.; Greene, W.H.; Young, V.M. and Wiernik, P.H. (1974): Significance of *Pseudomonas aeruginosa* in the patient with leukemia or lymphoma. J.Infect.Dis. 130 suppl., 24
- (124) Seltmann, G. (1982): Die bakterielle Zellwand. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart

- (125) Siegenthaler, W.; Fuchs, P. and Lüthy, R. (1980):
Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections.
In: Sabath, L.D. (ed.): *Pseudomonas aeruginosa*.
Verlag Hans Huber, Bern-Stuttgart-Wien
- (126) Spearman-Kärber (1978): *Angewandte Statistik, Statistische Methoden und ihre Anwendungen*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 5. Aufl.
- (127) Towbin, M.; Staehlin, T. and Gordon, J. (1979):
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.
Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 76, 4350
- (128) Tsay, G.C. and Collins, M.S. (1984): Preparation and characterization of a nontoxic polysaccharide-protein conjugate that induces active immunity and passively protective antibody against *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 1 in mice.
Infect.Immun. 45, 217
- (129) Wilkinson, S.G. and Galbraith, L. (1975): Studies of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*.
Eur.J.Biochem. 52, 331
- (130) Wood, R.E.; Boat, T.F. and Doershuek, C.F. (1976):
Cystic fibrosis. Am.Rev.resp.Dis. 113, 833
- (131) Yoshimura, F.; Zalman, L.S. and Nikaido, H. (1983):
Purification and properties of *Pseudomonas aeruginosa* porin. J.Biol.Chem. 258, 2308
- (132) Young, L.S. (1972): Human immunity to *Pseudomonas aeruginosa*. II. Relationship between heat-stable

opsonins and type-specific lipopolysaccharide.
J.Infect.Dis. 126, 277

- (133) Young, L.S.; Meyer, R.D. and Armstrong, D. (1973):
Pseudomonas aeruginosa vaccine in cancer patients. Ann.Intern.Med 79, 518
- (134) Young, L.S. and Pollack, M. (1980): Immunologic
approaches to the prophylaxis and treatment of
Pseudomonas aeruginosa infection. In: Sabath,
L.D. (ed.): Pseudomonas aeruginosa. Verlag Hans
Huber, Bern-Stuttgart-Wien
- (135) Zwisler, O. (1984): Neuentwicklung von Impfstoffen.
Die gelben Hefte, XXIV. Jahrg., 3/84, 93

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Institut sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c.mult. A. Mayr danke ich für die Betreuung seitens der Tierärztlichen Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. B.U. von Specht für die Überlassung des Themas sowie für seine anregenden Ratschläge und seine wohlwollende Betreuung bis zum Abschluß dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Dr. W. Ehret und den Damen seines Labors für die gewährte Hilfe anlässlich der mikrobiologischen Arbeiten.

Für die technische Unterstützung und stetige Hilfsbereitschaft danke ich Fräulein U. Schwarz, Frau E. Stürzer, Fräulein M. Vincent sowie allen Tierpflegern des Tierstalles.

Lebenslauf

Ich wurde am 21. März 1955 als zweites Kind des Lehrers Georg Strigl und seiner Frau Anna, geb. Ertlmaier, in Mainburg geboren.

1961-1964:	Volksschule in Mainburg
1965-1974:	Besuch des Gabelsberger Gymnasiums Mainburg (math. nat. Gymnasium)
Juni 1974:	Reifeprüfung
Juli 1974 bis September 1975:	Ableistung des Wehrdienstes in Landshut/Ndb.
November 1975 bis März 1976:	Studium der Rechtswissenschaften in Regensburg
Oktober 1976 bis Juni 1977:	Studium der italienischen Sprache an der Università per Stranieri in Perugia/Italien
Oktober 1977 bis Juli 1978:	Studium der Tiermedizin an der Univer- sität Pisa/Italien
November 1978 bis März 1984:	Studium der Tiermedizin an der Univer- sität München
15. März 1984:	Staatsexamen der Veterinär-Medizin
30. März 1984:	Approbation
Mai 1984 bis August 1985:	Doktorand am Institut für Chirurgische Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität München
seit September 1985:	Assistent in einer Großtierpraxis

